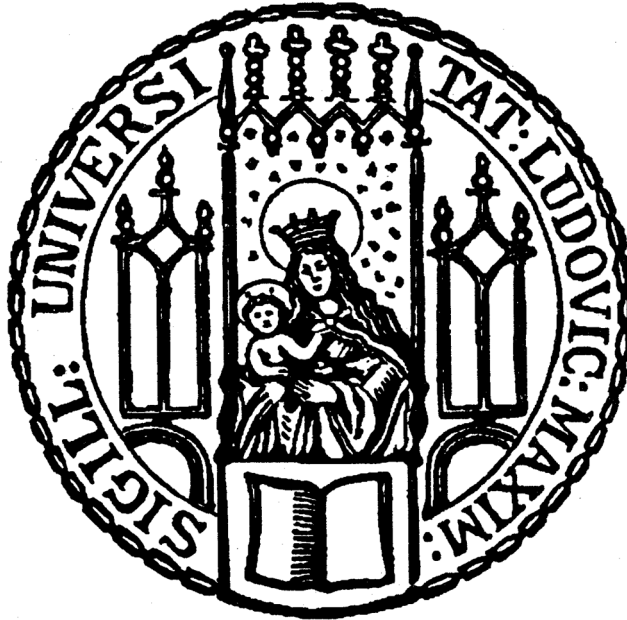


Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans



Rolle der endothelialen Glutathionperoxidase 4 bei der Subarachnoidalblutung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katherina Ponnath, geb. Werchoturov

aus

Kiew

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Schichor Prof. Dr. med. Uwe Ködel
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. vet. Manuela Schneider
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2020

Für Ophelia

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Rolle der endothelialen Glutathionperoxidase 4 bei der Subarachnoidalblutung

Selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 08.07.2019

Katherina Ponnath, geb. Werchoturov

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schlaganfall – Geschichte und Gegenwart	1
1.2 Subarachnoidalblutung	3
1.2.1 Ätiologie	3
1.2.2 Sozioökonomische Bedeutung	4
1.2.3 Zentrale pathologische Vorgänge bei SAB	5
1.3 Glutathionperoxidase 4 als wichtiges Antioxidans	8
1.4 Vitamin E als wichtiger Synergist der Gpx4	9
1.5 Endothelspezifisches Gpx4 Knockout Mausmodell	11
1.6 Fragestellung und Hypothese	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialliste	14
2.1.1 Material zur Vorbereitung der Versuchstiere	14
2.1.2 Material für Genotypisierung mittels PCR	14
2.1.3 Material für die intraluminale SAB-Induktion	15
2.1.4 Material für Histologie	17
2.2 Tierhaltungsbedingungen	17
2.3 Versuchsdurchführung	18
2.3.1 Induzierbare, endothelspezifische Gpx4 Knockout Mäuse	18
2.3.2 Genotypisierung der Versuchstiere	20
2.3.3 Modell der experimentellen Subarachnoidalblutung (SAB)	22
2.3.4 Narkose und Medikation	22
2.3.5 Intraoperatives Monitoring	23
2.3.6 Induktion der SAB	26
2.3.7 Postoperative Beurteilung nach SAB	28
2.3.8 Perfusion der Maus	29
2.3.9 Histologie	30
2.4 Versuchsgruppen und experimentelles Design	33

2.5 Statistische Datenauswertung	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Versuchsgruppe 1: SAB bei Gpx4 ^{iECWT} und Gpx4 ^{iECKO} -Tieren im Alter von sechs bis acht Wochen	38
3.1.1 Intraoperative Parameter	38
3.1.2 Outcome nach SAB	43
3.1.3 Histologie.....	46
3.2 Versuchsgruppe 2: SAB bei Gpx4 ^{iECWT} und Gpx4 ^{iECKO} -Tieren im Alter von sechs bis acht Monaten	50
3.2.1 Intraoperative Parameter	51
3.2.2 Outcome nach SAB	55
3.2.3 Histologie.....	60
3.3 Versuchsgruppe 3: SAB bei Gpx4 ^{iECWT} und Gpx4 ^{iECKO} -Tieren im Alter von sechs bis acht Wochen unter Vitamin E-Mangel.....	62
3.3.1 Intraoperatives Monitoring	62
3.3.2 Outcome nach SAB	68
3.3.4 Histologie.....	73
4 Diskussion	78
4.1 Methoden und Material	78
4.2 Ergebnisse	82
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	86
6 Summary and Outlook.....	87
7 Abkürzungsverzeichnis.....	88
8 Danksagung	91
9 Literaturverzeichnis	93

1. Einleitung

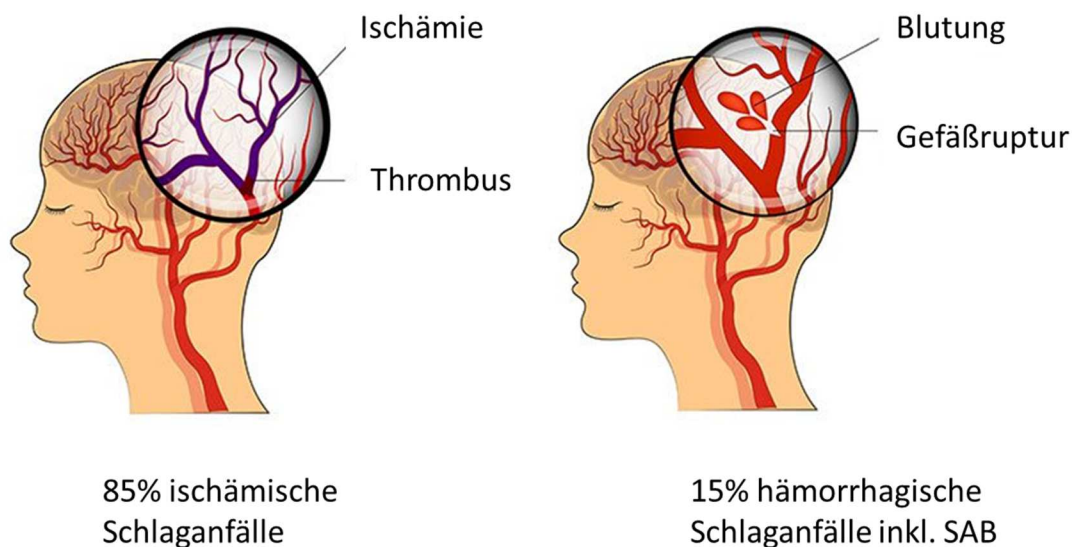
1.1 Schlaganfall – Geschichte und Gegenwart

“Wenn Menschen aus guter Gesundheit und mit Kopfschmerzen zusammenbrechen, sprachlos am Boden liegen und schwer atmen, dann versterben sie innerhalb von 7 Tagen“

Hippokrates 460-370 v. Chr.

Bereits im Jahre 400 v. Chr. beschrieb Hippokrates das zentrale Krankheitsbild dieser Arbeit (1). Die Symptome Kopfschmerzen, Kollaps, Schweratmigkeit sowie das Attribut „aus guter Gesundheit“ sprechen klar für diese eine Unterform des Schlaganfalls - die Subarachnoidalblutung (2).

Es gibt zwei Arten von Schlaganfall – den ischämischen und den hämorrhagischen.



Modifiziert aus: Web. URL <<https://www.chronobiology.com/de/melatonin-und-haemorrhagischer-schlaganfall-nahrungsergaenzung-fuehrt-zu-besseren-patientenergebnissen/>> 15.06.2019

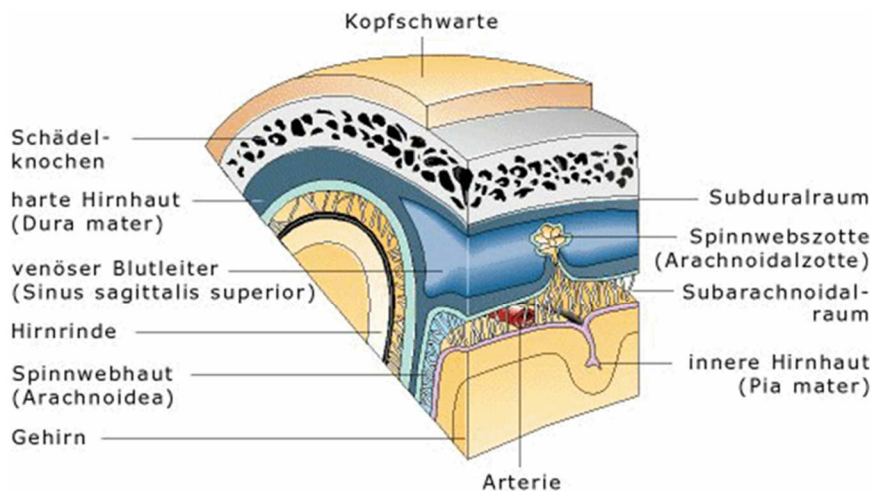
Abbildung 1. Ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall. Links schematisch abgebildet die Entstehung des ischämischen Schlaganfalls durch einen Thrombus in einem zerebralen Gefäß. Er macht 85% aller Schlaganfälle aus. Rechts ist das Prinzip eines hämorrhagischen Schlaganfalls durch Ruptur eines Gefäßes dargestellt. Dieser stellt 15% aller Schlaganfälle dar und beinhaltet auch die SAB.

Diese beiden Formen des Schlaganfalls unterscheiden sich stark in ihrer Häufigkeit. Der ischämische Schlaganfall stellt mit 85% die häufigste Schlaganfallart dar, der hämorrhagische Schlaganfall tritt entsprechend in 15% der Fälle auf (2). Letzterer geht trotz niedrigerer Fallrate

mit einer deutlich höheren Letalität einher (3). Die Subarachnoidalblutung (SAB), eine Unterart des hämorrhagischen Hirnschlages, macht zwar nur 5-10% aller Schlaganfälle aus, verursacht aber 25% aller Schlaganfalltoten (2). Dabei kommt es zu einer arteriellen Blutung in den Subarachnoidalraum, der zwischen Arachnoidea und Pia Mater liegt, und mit liquor cerebrospinalis gefüllt ist (siehe Abbildung 2). Der Großteil der Betroffenen ist relativ jung und steht in aller Regel mitten im Berufsleben. Das Durchschnittsalter der SAB-Patienten liegt bei 55 Jahren (2). Bis auf wenige Ausnahmen ereignen sich die Blutungen aus „guter Gesundheit“, wie Hippokrates so treffend beschrieb (1). „Noch nie zuvor erlebten, stärksten Kopfschmerz“ geben dabei die meisten Patienten bei Ankunft in der Notaufnahme als Leitsymptom an (4, 5). Doch ein Drittel kommt dort niemals lebend an (6).

Weltweit erleiden jedes Jahr 1,2 Millionen Patienten eine SAB; in Europa 50.000 und in Deutschland 10.000 Patienten (7, 8). Die Hälfte davon überlebt die ersten 30 Tage nach dem Schlaganfall nicht (9). Im Vergleich dazu ist der ischämische Schlaganfall für ca. 5,3 Millionen Tote weltweit verantwortlich, rund 55.000 davon in Deutschland (10). Insgesamt versterben jedes Jahr 6,2 Millionen Menschen an einem Schlaganfall. Dies entspricht der Bevölkerung der Schweiz oder einer Großstadt wie Madrid (11).

Was hat sich aber seit Hippokrates im Bezug auf die SAB getan? Was konnte man in den nun mehr als 2400 Jahren für die Patienten erreichen? Erschreckend wenig. Die Sterblichkeitsrate liegt heute immer noch bei mehr als 50% (2). Von den Überlebenden erholt sich nur etwa ein Achtel ohne Folgeschäden, was wiederum heißt, dass von allen Patienten nur knapp 12% ihre vorherige Lebensqualität wiedererlangen (2, 12).



Modifiziert aus Web. URL <<http://www.medizinkompakt.de/subarachnoidalraum>>, 15.06.2019

Abbildung 2. Subarachnoidalraum – Lokalisation der SAB. Der Subarachnoidalraum befindet sich zwischen der Arachnoidea und der Pia mater. Dieser Raum füllt sich im Falle einer SAB mit Blut.

1.2 Subarachnoidalblutung

1.2.1 Ätiologie

85% aller SAB-Fälle sind das Ergebnis eines rupturierten intrakraniellen Aneurysmas (2, 13). Von diesen sind wiederum über 85% im vorderen Teil des Circulus Arteriosus Willisii an den Gefäßbifurkationen - den Orten größter hämodynamischer Belastung - lokalisiert (14). Konkret stellen die bevorzugten Lokalisationen für rupturierende Aneurysmen die A. communicans anterior (ACA) oder die A. cerebri anterior (ACA) (zu 40%), die A. carotis interna (ACI) (zu 30%) und die A. cerebri media (ACM) (zu 20%) dar (2, 15).

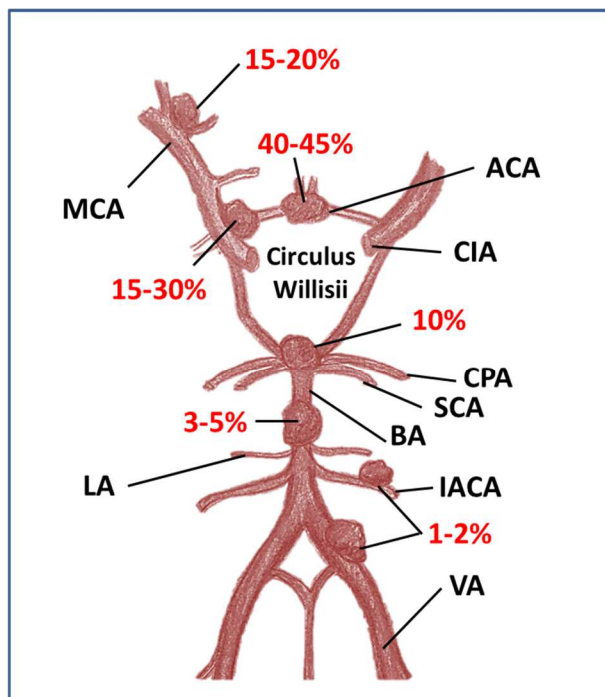


Abbildung 3. Häufigste Lokalisationen von Aneurysmen. Schematisch abgebildet der Circulus Willisii. Die rundlichen Ausbuchtungen stellen die am häufigsten rupturierenden Aneurysmen bei einer SAB dar. 40-45% aller Aneurysmen befinden sich dabei im vorderen Teil des Circulus Willisii an der A. communicans anterior (ACA) und 15-30% an der A. carotis interna (ACI).

Weitere Ursachen einer SAB können in Venenthrombosen, allergischen Erkrankungen, mykotischen oder bakteriellen Infektionen sowie Intoxikationen und Neoplasien begründet sein (2). In dieser Arbeit versuchten wir die häufigste Entstehungsursache einer SAB – die Ruptur eines Aneurysmas – am Mausmodell nachzuahmen.

Zu den Hauptrisikofaktoren der SAB zählen u.a. Rauchen, erhöhter arterieller Blutdruck sowie Alkoholmissbrauch (16, 17). Die genetische Komponente scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen - 7-20% der Betroffenen haben einen Verwandten ersten oder zweiten Grades mit einem gesicherten intrakraniellen Aneurysma (2). Auch Menschen mit dunkler Hautfarbe (18), Frauen (19), sowie die Bewohner von Japan und Finnland (20) haben ein etwas höheres Risiko an einer SAB zu erkranken (21, 22).

1.2.2 Sozioökonomische Bedeutung

Da mehr als die Hälfte der Patienten mit einer SAB jünger als 55 Jahre alt ist, stellt diese Schlaganfallart neben der medizinischen auch eine nicht zu unterschätzende sozioökonomische Herausforderung dar (23, 24). 50% der Betroffenen sterben in den ersten 30 Tagen nach Auftreten einer SAB (25) und nur 25% können an ihren Arbeitsplatz zurückkehren; bis zu 50% der Überlebenden bleiben dauerhaft schwerbehindert (2). Insgesamt erreichen 60-70% der Betroffenen nicht mehr dieselbe Lebensqualität wie vor der SAB (26).

Der gesamtwirtschaftliche Produktivitätsverlust infolge einer SAB ist fast so hoch wie in Folge eines ischämischen Schlaganfalls und das obwohl dieser mehr als 20 Mal häufiger vorkommt (27, 28).

Die lebenslangen direkten Kosten eines Schlaganfallpatienten belaufen sich in Deutschland auf ca. 43.000 Euro pro Jahr (29). Somit addieren sich die Kosten der SAB in Deutschland auf rund 437 Millionen Euro (28).

Das betrifft allerdings allein die Ausgaben für die Krankenhausaufenthalte, Rehabilitation und Medikamente, die direkten Kosten also (30). Was oft allerdings nicht berücksichtigt wird, sind die vielfach höheren indirekten Kosten (31). Dazu zählen beispielsweise Zahlungen für Pflegeheime, Verdienstaufschüsse sowie Berufsunfähigkeits- und Hinterbliebenenrenten. Während die direkten Kosten in erster Linie die Gesundheitskassen finanziell belasten, verursachen die indirekten Kosten eine enorme, stark steigende gesamtwirtschaftliche Belastung (32).

In Deutschland gibt es jährlich ca. 10.000 neue SAB-Fälle (7). Die dadurch bedingten 5.000 Todesfälle verursachen neben den direkten Kosten für die anfängliche Behandlung von 270 Millionen Euro weitere Ausgaben für Witwen- und Waisenrenten. Das liegt u.a. daran, dass die SAB-Patienten, wie bereits erwähnt, vergleichsweise jung sind, und mehr noch als ältere Patienten familienbezogene finanzielle Verpflichtungen haben. Die übrigen 5.000 Patienten bleiben größtenteils schwerbehindert und können nicht mehr arbeiten, was wiederum Kosten für die intensive Nachsorge sowie Berufsunfähigkeitsrenten mit sich zieht. Die Mittelwerte solcher Renten miteinberechnet, ergibt sich somit nahezu die gleiche Höhe an indirekten wie an direkten Kosten (30, 33). Dies führt hochgerechnet zu einer Summe von über einer Milliarde Euro pro Jahr. Dazu kommt die vielfach unentgeltlich vollzogene Pflegetätigkeit von Angehörigen, deren Kosten nicht bekannt sind.

1.2.3 Zentrale pathologische Vorgänge bei SAB

Vasospasmus, oxidativer Stress und die antioxidative Antwort

Die hohe Mortalität sowie Morbidität der SAB sind vor allem durch ihre zwei Hauptkomplikationen bedingt. Zum einen sind es die **Nachblutungen**, die bevorzugt in den ersten sieben Tagen auftreten, und zum anderen die zerebrale Ischämie infolge eines **zerebralen Vasospasmus** (34, 35). Die Ersteren lassen sich oft beim rechtzeitigen Einschreiten neurochirurgisch bzw. neuroradiologisch mit *Clipping* oder *Coiling* behandeln (36, 37). Dabei wird die Blutungsquelle – meist ein geplatztes Aneurysma - mechanisch mit einem Klipp oder einem Coil versorgt und somit weiteren Blutungen vorgebeugt (38).

Gegen den Vasospasmus und die daraus resultierende zerebrale Ischämie existiert dagegen bis heute keine kausale Behandlung (39).

Die Therapie beschränkt sich nach wie vor auf die Erhöhung des systemischen Blutdrucks (Hypertonie), die Erhöhung des Blutvolumens (Hypervolämie) und einer Verringerung des Blutviskosität (Hämodilution), der so genannten Triple-H-Therapie (9).

Zahlreiche pharmakologische Therapieversuche u.a. mit Magnesium, Statinen, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Nebivolol, Tirilizad, Ebselen, Erythropoietin sowie Glyburiden oder Curcumin zeigten keinen relevanten Erfolg (40-42). Lediglich der Kalziumkanalblocker Nimodipin wies einen reduzierenden Effekt auf die Ischämie sowie Nachblutungen auf (43). Der Vasospasmus tritt bei über 50% aller das initiale Ereignis überlebenden SAB-Patienten auf und findet in den ersten drei bis zehn Folgetagen statt, mit einem Höhepunkt am siebten Tag (44).

Bereits vor 2500 Jahren beschrieb Hippokrates als Erster diese meist eine Woche nach SAB auftretende Vasospasmus-Symptomatik: *“Wenn Menschen aus guter Gesundheit und mit Kopfschmerzen zusammenbrechen, sprachlos am Boden liegen und schwer atmen, dann versterben sie innerhalb von 7 Tagen“* (Hippokrates 460-370 v. Chr.) (1).

Der Vasospasmus erhöht nicht nur die akute Mortalität, sondern wegen der sekundären Ischämie auch die langfristige Morbidität (45, 46).

In den letzten Jahrzehnten hat man sich auf die Behandlung der verzögerten Vasospasmen der großen intrakraniellen Gefäße konzentriert, die 4-14 Tage nach der SAB bei mehr als einem Drittel der Patienten auftraten (47, 48). Höhepunkt dieser Untersuchungen stellte 2011 die CONSCIOUS-2-Studie mit Clazosentan dar, einem Endothelin-1-Rezeptor-Antagonisten (49). Damit konnte man zwar den Vasospasmus nach der SAB reduzieren, nicht aber das Überleben der Patienten signifikant steigern (49). Bereits 1975 gab es Untersuchungen dazu, dass der späte Vasospasmus der großen intrakraniellen Arterien nicht mit dem schlechten

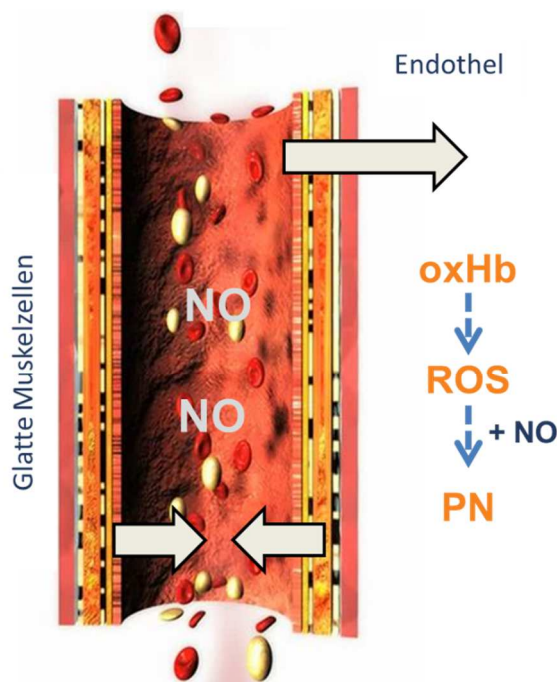
Outcome nach der SAB korreliert (50). Diese Ergebnisse führten zu einem Paradigmenwechsel und ließen an Pathomechanismen denken, die bereits viel früher als der Vasospasmus der großen Gefäße auftrat denken (48, 51, 52). Man wandte sich der Erforschung der frühen Phase der SAB, der ersten 48 Stunden, zumal in dieser Zeit die Mortalität vier mal so hoch war wie in der späten Phase (53-55). Es zeigte sich, dass schon kurz nach der Akutphase eine Minderperfusion bestand, obwohl sich die großen Gefäße noch gar nicht konstringiert hatten (51, 56). Das Augenmerk fiel auf die kleinen Arteriolen und die verminderte piale Kapillardichte, die dafür verantwortlich zu sein schienen (57-60). Und tatsächlich konnte man schon in den ersten Stunden nach der SAB dort eine Reduktion des Gefäßlumens um 30% beobachten, was nach den physikalischen Gesetzen bereits an diesem Punkt zu einem vierfach erhöhten Gefäßwiderstand und damit einer signifikanten zerebralen Minderperfusion und Ischämie führte (57, 59). Man wandte sich in den letzten Jahren daher immer mehr dem Studium der früheren Prozesse nach der SAB zu, z.B. der verminderten zerebralen Mikrozirkulation (48, 61, 62).

So trifft man seit einigen Jahren in der SAB-Forschung vermehrt auf einen neuen Begriff: *Early Brain Injury* (EBI) (62-64). Nachdem sich die Fokussierung auf den verzögerten Spasmus großer Hirngefäße als nicht effektiv erwiesen hat, richtete sich das Augenmerk auf die Ereignisse, die vor dem verzögerten Vasospasmus auftreten (65). Der Begriff EBI umfasst mehrere komplexe pathologische Vorgänge unmittelbar nach Auftreten der SAB (66). Dazu gehört erstens eine **mechanische** Komponente mit gesteigertem intrakraniellm Druck und gleichzeitig verringerter zerebraler Durchblutung (51, 60). Daraus folgt eine globale zerebrale **Ischämie**, die das ganze Gehirn betrifft (48). Dadurch wird die Ionenhomöostase gestört und es kommt zu einem zytotoxischen **Hirnödem** (63). Drittens ist nach einer SAB auch die **vaskuläre Integrität** aufgehoben. Dies passiert u.a. aufgrund des Endothelverlusts und der Basalmembranzerstörung mit anschließendem vasogenen **Hirnödem** (66). Schließlich kommt es zu massiven **molekularen** Veränderungen in der Phase der EBI (67). Dazu gehören erhöhte Thrombin- und Endothelin-Ausschüttung, Inflammation, eine gestörte Aktivität von Stickstoffmonoxid (NO) Synthase (NOS) und damit zur reduzierten Produktion von NO, dem wichtigsten endothelialen Vasodilatator (68-71). Austritt von Blut in den Subarachnoidalraum führt zu vermehrter Bildung von OxyHämoglobin (OxyHb) und oxidiertem Billirubin (BOX) (72, 73). All diese Prozesse resultieren in einer übermäßigen Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (74). Zu ihnen zählen Hyperoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Peroxylradikale (ROO^{\cdot}), Alkoxylradikale (RO^{\cdot}) von Lipiden, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und in Verbindung mit NO auch Peroxynitrit (PN) (75-77) (siehe

Abbildung 4). Diese chemischen Verbindungen verursachen einen massiven oxidativen Stress. Oxidativer Stress entsteht, wenn mehr freie Radikale (ROS) gebildet werden, als von körpereigenen antioxidativen Abwehrmechanismen unschädlich gemacht werden können. Zu den Folgen des oxidativen Stresses gehören u.a. **DNA Schäden** und die **Lipidperoxidation**, die beide zum Zelltod führen können (78, 79).

Diese vier SAB-Komponenten – die mechanische, ionische, vaskuläre und molekulare Komponente – führen schließlich zu **Gewebeschäden** (80, 81). In Folge des Gewebeschadens, der zur massiven Freisetzung von K-Ionen in den Extrazellulärraum führt, kann es zu sog. **kortikalen Streudepolarisierung** (*Cortical Spreading Depolarisation; CSD*) kommen. Dabei handelt es sich um eine Depolarisation des Kortex, die sich langsam über den Kortex ausbreitet (82). Da eine CSD viel Energie benötigt, die während einer Mangeldurchblutung in aller Regel nicht zur Verfügung steht, entstehen durch CSD weitere Gewebeschäden (64).

EBI und Vasospasmus überschneiden sich an mehreren Punkten, sodass sie nicht nacheinander, sondern vielmehr ineinander übergreifend auftreten (65). Solch ein überlappendes Ereignis stellt vor allem der **oxidative Stress mit folgender Lipidperoxidation** dar (83, 84).



Modifiziert aus Web. URL <<http://www.medizinkompakt.de/subarachnoidalraum>>, 15.06.2019

Abbildung 4. SAB und vermehrte Bildung freier Radikale. Querschnitt durch ein zerebrales Blutgefäß. Der Austritt von Blut in den Subarachnoidalraum nach einer SAB (großer Pfeil) führt zu vermehrter Bildung von Oxyhämoglobin (OxyHb). Es kommt zu einer übermäßigen Entstehung freier Sauerstoff-Radikale (*Reactive Oxygen Species* (ROS)), die partiell mit Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator, zu Peroxynitrit (PN) reagieren. Dies führt zu einer verminderten

Menge an NO, zur Vasokonstriktion (zwei kleine Pfeile) und letztlich zur Ischämie in diesem Bereich.

Der Körper reagiert auf diese gesteigerte ROS-Produktion mit einer **antioxidativen Antwort** (85). Dazu sind Säugetiere mit einer breiten Facette an antioxidativ wirksamen Systemen ausgestattet (86). Diese lassen sich grundlegend in endogene **enzymatische Systeme** sowie in meist **exogene, nicht-enzymatische** (über die Nahrung zugeführte) Antioxidantien einteilen. Zu den exogenen, nicht-enzymatischen gehören u.a. Vitamin A, Vitamin C und **Vitamin E**. Zu den antioxidativ wirksamen Enzym-Systemen zählen u.a. die Superoxiddismutasen (SOD), Katalasen (CAT, diese kommen allerdings nicht im Gehirn vor) sowie die **Familie der Glutathionperoxidasen (Gpx)** (74, 87, 88).

Eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr bei einem zerebralen Vasospasmus scheint in diesem Zusammenhang vor allem die Klasse der Glutathionperoxidasen zu spielen (89-91). Erhöhte Konzentrationen an Lipidperoxiden samt verstärkter Gpx-Aktivität in der zerebrospinalen Flüssigkeit beobachtete man nämlich schon vor langer Zeit bei den SAB-Patienten mit anschließendem Vasospasmus. (89). Weiter konnte in früheren Studien durch die Gabe eines Gpx-Mimetikums das Auftreten eines Vasospasmus nach SAB bei Mäusen, die einem starken oxidativen Stress ausgesetzt waren, vermieden werden (90, 91).

1.3 Glutathionperoxidase 4 als wichtiges Antioxidans

Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) gehört zur Familie der Selen-abhängigen Glutathionperoxidasen, besitzt somit ein Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum, wodurch die Gpx4 ein hohes enzymatisches Reaktionspotential erhält. Für die Gpx4 sind bisher drei Isoformen beschrieben - die zytosolische, die mitochondriale und die spermienkern-spezifische oder nukleäre Form (92, 93). Die zytosolische Form ist nahezu ubiquitär vorhanden und ist für das embryonale Überleben bei Mäusen essentiell (94-97). Die beiden anderen Enzymformen kommen v.a. im Hodengewebe vor und sind primär für die männliche Fertilität relevant (98-100). Im Rahmen dieser Arbeit wird die zytosolische, ubiquitär vorhandene Form der Gpx4 betrachtet.

Doch warum liegt das Zentrum unseres Interesses im Rahmen des Themenkomplexes SAB und EBI ausgerechnet auf der Gpx 4? Schon bei der Erstbeschreibung wurde die Gpx4 als ein Enzym beschrieben, das biologische Membranen vor Peroxidation schützt (101). Bis dato ist Gpx4 nach wie vor das einzige Enzym, das komplexe Biomoleküle wie Lipidhydro- und Phospholipidhydroperoxide direkt zu reduzieren vermag. Somit spielt sie u.a. auch eine zentrale Rolle für den Schutz der **Endothelmembranen**, indem sie die Hydroperoxide in den Membran-Lipiddoppelschichten direkt reduziert, und sie somit unschädlich macht (102, 103). Nachdem im Krankheitsgeschehen der SAB, wie bereits beschrieben, die Gefäße mit ihren

pathologischen Prozessen in den **Endothelmembranen** eine Schlüsselrolle einnehmen (104-106), soll die Funktion der Gpx4 hier untersucht werden. Hierzu verwenden wir ein Mausmodell (s.u.), bei dem das Enzym Gpx4 spezifisch in den Endothelzellen ausgeschaltet ist, und induzierten hier eine experimentelle SAB, um so die Rolle dieses Enzyms unter verschiedenen Bedingungen bei dieser Erkrankung zu untersuchen.

1.4 Vitamin E als wichtiger Synergist der Gpx4

Zahlreiche Studien belegen, dass das komplexe antioxidative Schutzsystem des Körpers einen Mangel oder ein Fehlen einzelner antioxidativ wirkender Enzyme durch andere, redundant wirkende Enzyme oder Antioxidantien kompensieren (107). Für Vitamin E und Gpx4 sind diese synergistischen Effekte bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt (90, 108). Vitamin E ist ein Sammelbegriff für alle natürlichen und synthetischen Tocol- und Tocotrienol-Derivate, die die biologische Aktivität des α -Tocopherols aufweisen, das die bioaktivste in der Natur vorkommende Verbindung darstellt (109). Vitamin E ist in allen tierischen Zellmembranen vorhanden, muss aber über die Nahrung zugeführt werden, da es nur von Pflanzen synthetisiert werden kann (110). Es ist vor allem in pflanzlichen Ölen, Nüssen und Saaten enthalten. Es ist fettlöslich und aufgrund seiner chemischen Struktur sehr leicht zu oxidieren und deswegen in der Lage, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Membranen vor Lipidoxidation zu schützen (110-112). α -Tocopherol ist ein wichtiges Antioxidans in vivo, das synergisch mit Gpx4 seine Wirkung entfaltet (103). Ohne Gpx4 und Vitamin E können beispielsweise die Membranen der Endothelzellen nicht ausreichend vor den schädlichen Radikalen geschützt werden (108). Diese akkumulieren und führen unter anderem zu einer vermehrten Kontraktilität der Gefäße und Zelltod (113).

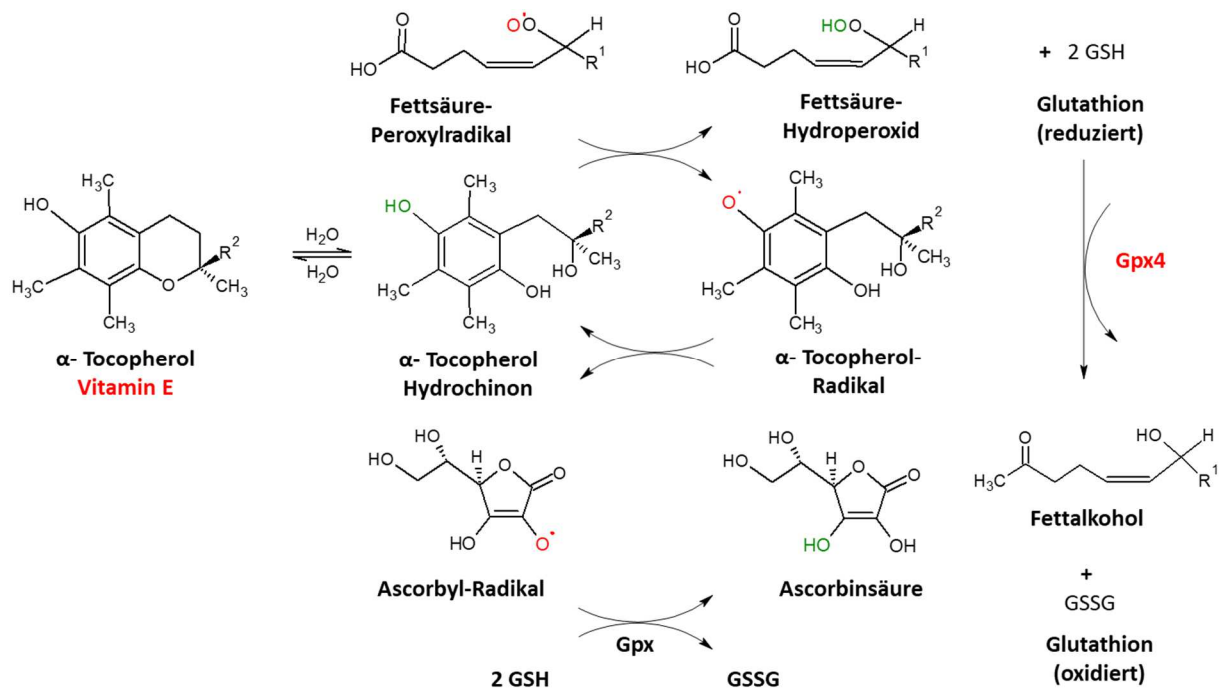


Abbildung 5. Zusammenspiel von Gpx4 und Vitamin E. In der Abbildung wird das Zusammenwirken von Vitamin E und Gpx4 an der Lipidperoxidation in einer chemischen Gleichung verdeutlicht. Infolge von Lipidperoxidation entstandene Peroxidationsprodukte wie α -Tocopherol-Radikale oder Fettsäureperoxyradikale spielen u.a. im Entzündungsgeschehen und in der Atherosklerose-Initiation eine bedeutende Rolle (114). Vitamin E wandelt diese Fettsäureperoxyradikale in Fettsäurehydroperoxide um. Gpx4 vermag als einziges Enzym diese Fettsäurehydroperoxide in der membranösen Doppelschicht zu Fettalkoholen direkt zu reduzieren (115).

Der Signalweg, über den Gpx4 und Vitamin E zusammenwirken, konnte mit Hilfe von Zellkultur-Studien an murinen embryonalen Fibroblasten und primären Neuronen nachgewiesen werden. So zeigen diese Zellen, bei denen das Gen für Gpx4 ausgeschaltet wurde, eine gesteigerte Aktivität der 12/15-Lipoxygenase, die wiederum zu einer massiv erhöhten Lipidperoxidation und letztendlich zum Zelltod führt (90). Durch die Zugabe von α -Tocopherol oder dem wasserlöslichen Vitamin-E-Derivat TROLOX (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) lässt sich dieser Zelltod effizient verhindern, wohingegen sich hydrophile Antioxidantien wirkungslos zeigten (90). Daraus ableiten lässt sich, dass Gpx4 vorzüglich in der **fettlöslichen**, ergo **membranösen** Umgebung und somit auch an den Membranen der Gehirndothelzellen, dem Ort unseres größten Interesses, agiert.

In einer Folgestudie wurden diese MEF-Zellen mittels zweier Protoonkogene transformiert und subkutan in Wildtyp-Mäuse injiziert. Interessanterweise bildeten auch Gpx4 Knockout-Zellen

Tumoren aus, deren Größe vergleichbar zu wildtypischen Tumoren waren, allerdings deutliche Unterschiede in der Morphologie des Tumorgefäßsystems zeigten (116). Die Knockout-Tumore entwickelten lediglich immature Mikrogefäße in hoher Dichte, wohingegen große maturierte Tumorgefäße nicht nachgewiesen werden konnten. Dieser Phänotyp konnte durch die Behandlung der tumortragenden Mäuse mit 12/15-Lipoxygenase-Inhibitoren aufgehoben werden (116).

Die Relevanz von Gpx4, insbesondere im Zusammenspiel mit Vitamin E, für das Gefäßendothel konnte in einer weiteren Studie belegt werden, in der endothelspezifische Gpx4 Knockout-Mäuse generiert und analysiert wurden (117). Unter normalen Standard-Haltungsbedingungen zeigten die endothelspezifischen Knockout-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp, sie erschienen gesund, waren fertil und erreichten eine normale Lebensspanne. Allerdings entwickelten diese Knockout-Mäuse im sogenannten ex vivo "Aortic Ring"-Modell deutlich weniger verzweigte und kürzere Gefäße als ihre wildtypischen Wurfgeschwister. Auch die Tatsache, dass ein Mangel an Gpx4 in isolierten embryonalen endothelialen Vorläuferzellen (eEPCs) zum raschen Zelltod führt, wies auf einen möglichen endothelialen Funktionsverlust hin. Analog zu den Gpx4-defizienten MEF-Zellen kann auch in den eEPCs der Zelltod durch die Substitution des wasserlöslichen Vitamin E-Derivats Trolox effizient verhindert werden (117).

Wurde nun der Vitamin E-Gehalt der Mausdiät reduziert, entwickelten die endothelspezifischen Gpx4 Knockout-Mäuse einen sehr deutlichen Phänotyp. So wurden in multiplen Organen vermehrt apoptotische Endothelzellen nachgewiesen, was infolge zu Thrombenbildung und multiplen Infarkten in diesen Organen führte (117).

Diese Vorarbeiten belegen, dass Vitamin E und Gpx4 synergistisch wirken. Unter einer Diät mit hohem Vitamin E-Gehalt sind die Mäuse phänotypisch vollkommen unauffällig und der endothelzellschädigende Effekt des Gpx4 Knockouts wird verhindert.

Beide sind somit im Zusammenspiel an der antioxidativen Abwehr in den Endothelzellen beteiligt; bei einem Mangel von Gpx4 im Endothel ist ein ausreichender Vitamin E-Spiegel erforderlich, um die Endothelfunktion zu erhalten. Diese Erkenntnisse nutzten wir bei der Gestaltung einer unserer drei Experimentenrunden (s.u.).

1.5 Endothelspezifisches Gpx4 Knockout Mausmodell

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktion der Gpx4 in den Gefäßen nach Auslösung einer experimentellen SAB in Mäusen detailliert untersucht werden. Für die Durchführung der

Versuche wurden die induzierbaren endothelspezifischen Gpx4 Knockout-Mäuse als Modell verwendet (117). Dieses Modell basiert auf dem vorher beschriebenen konditionalen Gpx4 Knockout-Mausmodell (90).

Wird die Gpx4 im Mausmodell durch einen globalen Gen-Knockout (KO) ubiquitär ausgeschaltet, ist dieser bereits früh embryonal letal, die Gpx4-KO-Tiere versterben intrauterin nach dem siebten Embryonaltag (95, 118). Um die Funktion der Gpx4 nun auch im adulten Organismus und in unterschiedlichen Geweben untersuchen zu können, etabliert M. Conrad ein konditionales Knockout-Modell unter Verwendung des sogenannten CRE/loxP-Systems (90). CRE (=cyclization recombina**s**e oder causes recombination) ist eine bekannte Rekombinase des Bakteriophagens 1 (119). Damit sie die Stellen in der DNA „erkennt“, die sie ausschneiden soll, sind die nötigen DNA-Abschnitte mit Erkennungsstellen markiert. Die Erkennungsstelle für CRE heißt loxP (Locus of Crossingover of P1 phage) (120). Ist also ein DNA-Abschnitt mit zwei solchen loxP-Erkennungsstellen flankiert, wird dieser DNA-Teil herausgeschnitten (121). Dies wird auch als „flox-Verfahren“ bezeichnet. „Floxed“ heißt dabei „flanked by loxP“, also „von loxP-Stellen flankiert“. Das gesamte Rekombinations-System wird als Cre/loxP-System bezeichnet (122, 123).

Beim endothelspezifischen Gpx4 Knockout Mausmodell wurde die Expression der CRE-Rekombinase zusätzlich unter die Kontrolle des Cdh5-Promotors gestellt, der in adulten Maus nur im Endothel aktiv ist (124). Dadurch wird der Knockout nur im Endothel induziert. Um den Knockout zu definierten Zeitpunkten induzieren zu können, wird die CRE-Rekombinase wiederum durch MER-Proteine (*mutated murine estrogen receptor ligand-binding domain*) im Zytosol blockiert. Durch die Gabe von Tamoxifen dissoziieren diese MER-Proteine und die CRE-Rekombinase disloziert in den Zellkern, um den Knockout auszulösen.

Wie bereits weiter oben beschrieben, zeigten die endothelspezifischen Knockout-Mäuse nach Tamoxifen-induzierter Gpx4-Deletion keinen offensichtlichen Phänotyp; wurden die Tiere allerdings auch Vitamin E depletiert, entwickelten sie Thromben und multiple Infarkte in verschiedenen Organen, die zu unterschiedlichen Krankheitsbildern (wie Lähmungserscheinungen und Niereninfarkten) oder zum Tod der Mäuse führte (117).

1.6 Fragestellung und Hypothese

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der endothelialen Gpx4 mit Hilfe des Modells der experimentellen SAB detaillierter zu untersuchen und deren Einfluss auf das Outcome nach dieser Schlaganfallart zu bestimmen.

Hierfür wurden insgesamt drei Hypothesen aufgestellt.

1. Die erste Arbeitshypothese lautete, dass ein Mangel an Gpx4 in allen Endothelzellen zu einem erhöhten oxidativen Stress in den Endothelzellen des Gehirns führt und es somit zu einer Verschlechterung des Outcomes nach SAB kommt.
2. Die zweite Hypothese lautete, dass das Alter per se einen chronisch erhöhten oxidativen Stress bedeutet, und ein zusätzlicher Verlust der Gpx4 in den Endothelzellen zu einer Akkumulation von oxidativem Stress und somit zu einer messbaren Verschlechterung des Outcomes nach SAB führt.
3. Die dritte Hypothese lautete, dass neben der Deletion der Gpx4 eine zusätzliche Vitamin E-Depletion zu einer kritischen Erhöhung des oxidativen Stresses und somit zu einer messbaren Verschlechterung des Outcomes führt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Material zur Vorbereitung der Versuchstiere

Gel-Wasserpeletts (HydroGel, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland)

Käfige (Käfig Typ 2 long, SealSafe Plus, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland)

Labortierstreu (Lignocel 3-4, Rettenmaier, Rosenberg, Deutschland)

Mäuse zur Etablierung des SAB-Induktionsmodells (C57/Bl6, Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

Neutralöl (Miglyol®812, Caelo)

Tierfutter - Standard (Trockenfutter, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, mit 18000 I.E./kg Vitamin A, 1280 I.E./kg Vitamin D3, 120 mg/kg Vitamin E)

Tamoxifen (4-Hydrotamoxifen, T5648, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

Tierfutter - Vitamin E arm (Diät Nr. 15791-147 mit 7mg/kg Vitamin E, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland)

Waage (EMB 3000-1 Kern, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland)

2.1.2 Material für Genotypisierung mittels PCR

1. Geräte

-20°C Gefrierschrank (GN1056 Liebherr Premium NO Frost, Liebherr AG, Bulle, Schweiz)

Geldokumentationssystem mit UV-Licht (Fusion FX7, Viber-Lourmat, Eberhardzell, Deutschland)

Horizontales Gelelektrophoresesystem (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Mini-Zentrifuge (Sprout, Heathrow Scientific, Lakeview Parkway Vernon Hills, USA)

Pipettierhelfer (Accu jet pro, Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland)

Thermocycler (s1000, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA)

Thermoschüttler (Thermomixer pro, Cell Media, Elsteraue, Deutschland)

Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA)

Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2. Chemikalien

Für DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen:

Phenol-Chloroform (CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland)

Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Für PCR:

Cre-Forward-Primer: 5'-GATGCAACGAGTGATGAGGTTCCGC-3' und

Cre-Reverse-Primer: 5'-ACCCTGATCCTGGCAATTTCCGGC-3' (Metabion, Martinsried bei München, Deutschland)

dNTP-Mix (5 PRIME GmbH, Hamburg, Deutschland)

H₂O (Aqua ad iniectabilia Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland)

MgCl₂ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

PF-Forward-Primer: 5'-ACTCCCCGTGGAACTGTGAGCTTTGTGC-3' und

PF-Reverse-Primer: 5'-ACTCCCCGTGGAACTGTGAGCTTTGTGC-3' (Metabion, Martinsried bei München, Deutschland)

Taq-Polymerase (GoTaq, DNA-Polymerase, Promega, Madison/WI, USA)

Für Geldokumentation:

Agarose (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland)

Cyaninfarbstoff SYBRSafe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA)

DNA-Leiter (peqGOLD50bp, Peqlab, Erlangen, Deutschland)

3. Pufferlösungen

Lyse-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 10 mM NaCl, 0,5% SDS, 200 µg/ml Proteinase K

PCR-Puffer (5X Green GoTaq Reaction Buffer, Promega, Madison/WI, USA)

TAE-Puffer: 40 mM Trisacetat und 1 mM EDTA im Verhältnis 1:50 mit vollentsalztem Wasser verdünnt (PRIME GmbH, Hamburg, Deutschland)

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

2.1.3 Material für die intraluminale SAB-Induktion

1. Geräte

2-Kanal-Laser-Doppler-Gerät (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden)

Bohrerkopf (Aesculap GD 870R, 08 x 5,1 mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Glasfasersonde (MT B500-0, Perimed, Stockholm, Deutschland)

Heizplatte mit Homöostasegerät (FHC Temperature Controlex, Bowdoin, ME, USA)

ICP-Messgerät (ICP Express-System, Codman, Johnson & Johnson, Großbritannien)

ICP-Sonde (Codman, Norderstadt, Deutschland)

Isofluran-Vernebler (Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Kleintierrespirator (Minivent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

Laser-Doppler-Messsonde (Periflux 5000, Perimed, Schweden)

Mikrokapnograph (CI 240, Columbus Instruments, Ohio, USA)

Mikrokapnograph-Sonde (CI 240, Columbus Instruments, Ohio, USA)

Nasenklemme (David Kopf Instruments, USA)

Operationsmikroskop mit Lichtquelle (KL2500LED, Leica, Wetzlar, Deutschland)

Präzisionsbohrer (Rewatronic Products, Wald-Michelbach, Deutschland)

Wärmeinkubator (Mediheat, Peco Servoces Ltd, Cumbria, Großbritannien)

2. Op-Bedarf

20-Gauge-Venenverweilkatheter (Vasofix Braunüle B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; Größe 1,1x33 mm Gauge 20, rosa)

Dentalzement (Poly F Plus, Boudex, Dentsply, DeTrey, Konstanz, Deutschland)

Gefäßclips (Peter Lazig GmbH, Tuttlingen, Deutschland)

Hautfaden (Ethibond 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

OP-Besteck (Schreren, Pinzetten) (FST, Berlin, Deutschland)

SAB-Induktions-Faden (Prolene 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

Saugtupfer (Sugi, Kettenbach, Eschenburg, Deutschland)

Sekundenkleber (Maxi-Cure, Drechsel & Mehr, Weiden, Deutschland)

Skalpelli (Aeskulap, Einwegskalpell, Nr.11 und Nr.20, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Zweikomponentenkleber (Cyanoacrylate „Maxi-Cure“, Plastruc, City of Industry, Kalifornien, USA; Härter: Accelerator „Insta-Set“, City of Industry, Kalifornien, USA)

3. Medikamente

Antagonisierung der Narkose: Atipamezol (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Flumazenil (Inresa, Freiburg, Deutschland), Naloxon (Actavis, Ireland, USA)

Augen- und Nasensalbe (Bepanthen, Bayer Vital, Deutschland)

Carprofen (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Injektionsnarkose: Fentanyl (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), Medetomidin (Domitor, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Midazolam (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Isofluran (Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

NaCl-0,9%ige Lösung (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

O₂, O₂-N₂O-Gemisch (Linde AG, Pullach, Deutschland)

2.1.4 Material für Histologie

1. Perfusion

Flügelkanüle zur Perfusion (Butterfly-25 short, Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland)

PBS (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA)

PFA (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland)

2. Gießen in Paraffinblöcke

Einbettautomat (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Einbettkassetten (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland)

Paraffin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Paraffinausgießstation mit Kühlplatte (Histo-Star, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Rotationsmikrotom (Cool-Cut, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Trockenschrank (Thermocenter TC-40, Renggli AG, SalvisLab, Rotkreuz, Schweiz)

Wasserbad (WNB7, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland)

3. Fixierung und Nissl-Färbung

Methanol, Ethanol, Isopropanol, Roti@-histol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Nissl-Färbung mit Kresylviolett, Objektträger, Deckgläser (Eukitt, O.Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland)

RotiHistokitt II (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland)

4. Visualisation

Axiovision Software (SE 64 Re. 4.9.1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland)

Image J Software (NIH, USA)

Mikroskop (Axio Imager.M2, AxioCam MRc, x-Cite Series 120, EXFO, Power Supply 232, PS-System, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

2.2 Tierhaltungsbedingungen

Die Mäuse wurden in den Tierhaltungsräumen des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD) der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München unter standardisierten klimatischen Bedingungen (Käfighaltungssystem Tecniplast "Green Line") gehalten. Die Tiere hatten stets freien Zugang zu Wasser und Futter (je nach Versuchsgruppe Standarddiät Maus/Ratte Ssniff oder Vitamin-E-depletiertes Futter Ssniff). Die Tiere wurden in Gruppen von drei bis vier Tieren pro Käfig gehalten und zur Stressvermeidung wurde dabei

der Käfigbestand einige Wochen vor dem Experiment weder neu zusammengestellt noch getrennt. Postoperativ wurden die Mäuse in einem klimatisierten Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, Tecniplast) gehalten.

Die Lufttemperatur wurde bei $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit bei $55\pm 5\%$ konstant gehalten. Die Werte wurden täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Eine Zeitschaltuhr sorgte für einen zwölfstündigen Tag-/Nachtrhythmus. Das Hygienemonitoring erfolgte über Sentinelmäuse, die alle drei Monate gemäß den aktuellen FELASA-Richtlinien untersucht wurden.

2.3 Versuchsdurchführung

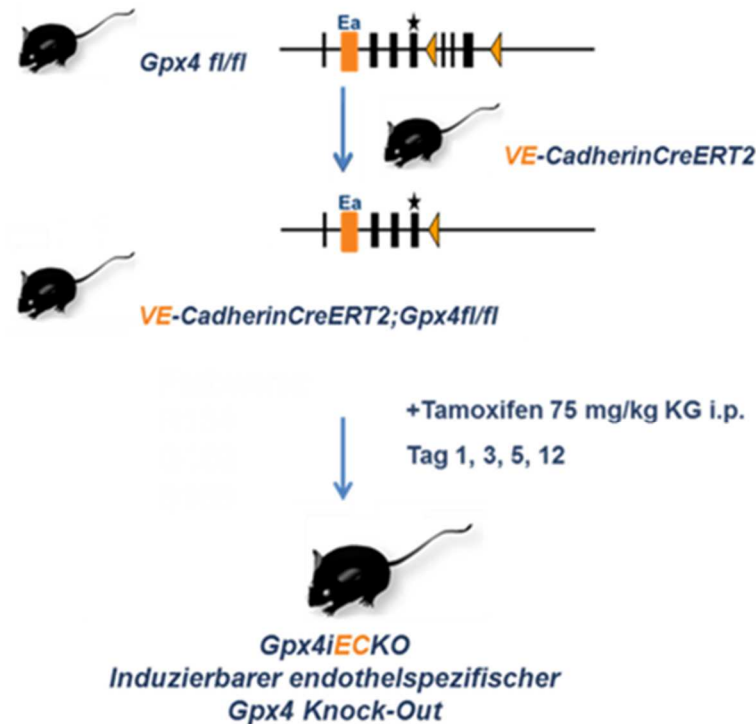
Die Versuche wurden von 2014 bis 2016 am ISD, LMU München, in der Arbeitsgruppe für experimentelle Schlaganfallforschung (Leitung Herr Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila) mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben Gz. 55.2-1-54-2532-154-2012) durchgeführt.

2.3.1 Induzierbare, endothelspezifische Gpx4 Knockout Mäuse

Wie bereits beschrieben, wird im Rahmen dieser Arbeit ein induzierbares, konditionales Knockout Mausmodell verwendet, bei dem das Gen für Gpx4 Zelltyp-spezifisch und zu einem definierten Zeitpunkt ausgeschaltet werden kann.

Für die Generierung des konditionalen Gpx4 Knockout Mausmodells wurden die Exons 5 bis 7 mittels loxP-Sites flankiert, diese dann von der CRE-Rekombinase erkannt, und der dazwischenliegende DNA-Abschnitt deletiert (90). Auf Exon 7 ist das für die Inkorporation von Selenocystein essenzielle SECIS-Element lokalisiert, dessen Entfernen den Funktionsverlust der Gpx4 bedeutet (90).

Für das hier verwendete endothelspezifische Mausmodell wurde die konditionale Gpx4 Mauslinie mit einer CRE-transgenen Mauslinie verpaart, bei der die Expression der CRE-Rekombinase durch Verwendung des endothelspezifischen Promotors VE-Cadherin (Vaskulär-endotheliales Cadherin, auch Cadherin(Cdh) 5) rein auf Endothelzellen beschränkt ist (124).



Modifiziert aus Wortmann M, Schneider M, et al. Circ Res. 2013

Abbildung 6. Zucht der induzierbaren endothelspezifischen Gpx4 Knockout Mäuse. Für die Zucht der endothelspezifischen Knockout Mäuse wurden Mäuse mit geflochten Gpx4-Allelen (fl/fl, die Dreiecke in Orange stellen die loxP-Stellen dar) mit Mäusen verpaart, die eine Tamoxifen-induzierbare endothelspezifische Cre-Rekombinase (VE-Cadherin CreERT2) exprimieren. Dadurch erhielt man endothelspezifische Knockout Mäuse, bei denen mit Hilfe der Applikation von Tamoxifen Gpx4 in den Endothelzellen ausgeschaltet werden kann ($Gpx4^{iECKO}$). Die schwarze horizontale Linie stellt dabei das aus sieben Exons (vertikale Striche) bestehende Gpx4-Gen dar.

Induktion des endothelspezifischen Gpx4 Knockout mit Tamoxifen

Wie bereits beschrieben, wird die Induzierbarkeit dadurch erreicht, dass die Cre-Rekombinase zunächst in einem Komplex mit MER-Proteinen vorliegt und dadurch verhindert wird, dass die Cre-Rekombinase in den Zellkern translozieren kann. Durch die Zugabe des Estrogenrezeptormodulators Tamoxifen wird die Cre-Rekombinase aus dem Komplex gelöst und kann den loxP-flankierten Genabschnitt deletieren (125).

Zur Knockout Induktion wurde das Tamoxifen (T5648, Sigma-Aldrich) in einem synthetischen Neutralöl (Miglyol®812, Caelo) gelöst. Die Konzentration der 10x Stocklösung betrug 15 mg/ml und wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für Applikationen wurde die Stocklösung mit Miglyol 1:10 verdünnt und jeweils 100 µl pro Tier und Tag intraperitoneal injiziert. Die

Knockout- und Kontrolltiere wurden direkt nach dem Absetzen im Alter von drei bis vier Wochen dreimal im Abstand von jeweils 48 Stunden und nochmals sieben Tage nach der letzten Injektion mit Tamoxifen induziert.

Der Genotyp der induzierten endothelspezifischen Gpx4 Knockout Mäuse wird im Folgenden als Gpx4^{ieCKO} bezeichnet und der Genotyp der Kontrolltiere als Gpx4^{ieCWT}. Als Kontrollen wurden Wurfgeschwister, die im Bezug auf Gpx4 homozygot gefloxt, aber nicht Cre-transgen waren, verwendet.

2.3.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Tiere wurden routinemäßig im Alter von drei Wochen nach dem Absetzen genotypisiert und ein weiteres Mal nach der Beendigung des Versuchs, um Verwechslungen auszuschließen. Verwendet wurde als Gewebematerial die Schwanzspitze. Daraus wurde die DNA extrahiert, die PCR durchgeführt, und die dabei entstandenen replizierten DNA-Abschnitte mittels Gelelektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennt.

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte über Mausschwanzspitzen. Hierfür wurden bei den Mäusen ca. 0,2 mm große Gewebeproben von der Schwanzspitze gewonnen und das Gewebe wurde bei -20°C bis zur DNA-Aufbereitung gelagert. Jede Schwanzspitze wurde mit 500 µm Lyse-Puffer und 7,5 µm Proteinkinase K versetzt und über Nacht in einem Thermoschüttler bei 55°C lysiert. Erfolgte die Lyse des Gewebes über Nacht nicht vollständig, wurde jede Gewebeprobe mit zusätzlichen 2 µm Proteinkinase K versetzt und nochmals für 20-30 Minuten in den Thermoschüttler bis zur vollständigen Lyse inkubiert.

Zur DNA-Extraktion wurden die lysierten Gewebeproben mit jeweils 500 µm Phenol-Chloroform-Gemisch versetzt. Danach wurden die Proben für ca. 30 Sekunden per Hand sorgsam geschwenkt und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur und 14000 x g (Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden aus der oberen Phase des Zwei-Phasen-Gemisches jeweils 200 µm vorsichtig abgenommen und in die 2,5-fache Menge Ethanol-Salz-Gemisch (500 µm 100% EtOH p.a. und 7,5 µm 5M NaCl) überführt. Die Proben wurden wiederum gut durchmischt und bei 4°C und 14 000 x g rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Das DNA-Pellet am Gefäßboden wurde zweimal mit 200 µm 70% EtOH p.a. gewaschen und anschließend bei 55°C im Thermoblock fünf Minuten lang getrocknet. Jedes DNA-Pellet wurde anschließend in

80 µm TE-Puffer aufgenommen und durch Schütteln gelöst. Die extrahierte und gelöste DNA wurde entweder bei -20°C gelagert oder sofort für die PCR verwendet.

PCR

Zur PCR-Vorbereitung wurden die DNA-Proben auf Raumtemperatur verbracht. Von jeder Probe wurden 2 µm DNA mit PCR-Reaktionsmix versetzt. Der PCR-Reaktionsmix je DNA-Probe wurde gemäß Herstellerangaben wie folgt zusammengesetzt:

H₂O (aqua dest.): 12 µl

dNTPs (1mM): 5 µl

Cre-Forward Primer (5 µM): 1,5 µl

Cre-Reverse Primer (5 µM): 1,5 µl

10X PCR-Puffer (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl): 2,5 µl

MgCl₂: 1,5 µl

Taq-Polymerase: 0,2 µl

Zur Vervielfältigung der DNA wurden die Reaktionsansätze in einen Thermocycler verbracht. Die Amplifikation setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

- | | |
|--|-------------|
| 1) Initiale Denaturierung bei 95°C, 1 min | ein Zyklus |
| 2) Denaturierung bei 95°C, 15 sec | } 35 Zyklen |
| 3) Primerhybridisierung 60°C, 15 sec | |
| 5) Elongation 72°C, 10 sec | |
| 6) Abkühlung auf 4°C nach Beendigung der PCR | |

Das fertige PCR-Produkt, die vervielfältigte DNA, wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

Gelelektrophorese

Dabei wurden die DNA-Proben in einem Agarosegel unter elektrischer Spannung aufgetrennt und so anhand ihrer Größe identifiziert.

Für die Gel-Elektrophorese wurden 12-15 µl des PCR-Produkts auf ein frisch hergestelltes 1,5%iges Agarose-Gel (150 ml TAE-Puffer, 2 g Agarose, 5 µl Cybersafe®) aufgetragen. Zur Größenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden zusätzlich 3 µl eines 50

Basenpaar (bp) DNA-Größenstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte lichtgeschützt in TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 60 Minuten. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe eines Geldokumentationssystems aufgenommen und ausgewertet.

2.3.3 Modell der experimentellen Subarachnoidalblutung (SAB)

Die SAB entsteht in erster Linie durch die Ruptur eines Gefäßes im vorderen Teil des Circulus Willisii. Dieses Krankheitsbild beim Menschen wurde experimentell durch Verwendung eines Fadenmodells nach Feiler bei der Maus induziert (126-128). Vor jeder Versuchsgruppe wurden der Arbeitsplatz und die OP-Instrumente gereinigt und desinfiziert, die Tiere gewogen und das Gewicht dokumentiert. Die intraoperative Überwachung der Vitalparameter sowie die Messung und Dokumentation der ICP- und der CBF-Werte erfolgte von Narkose-Einleitung bis 20 Minuten nach SAB-Induktion. Sämtliche Versuchstiergruppen wurden im Vorfeld randomisiert. Alle Experimente sowie die neurologische Untersuchung und die anschließende Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte verblindet.

2.3.4 Narkose und Medikation

Zur präoperativen Analgesie wurde den Mäusen Carprofen 4 mg/kg s.c. ca. 30 Minuten vor dem Eingriff injiziert. Die Anästhesie erfolgte mittels vollantagonisierbarer Injektionsanarkose. Zur Einleitung wurden die Mäuse in eine dafür angefertigte Acrylbox mit einem Gasgemisch (5% Isofluran und 95% Luftsauerstoff) kurzzeitig narkotisiert. Für die intraoperative Anästhesie wurde den Tieren im Anschluss eine Kombination aus Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) i.p. injiziert. Danach wurden die Tiere in Rückenlage unter dem OP-Mikroskop positioniert und unter Sicht oro-tracheal in einer 45°-Kopfhochlagerung intubiert. Als Intubationskatheter diente dabei eine eigens ummodellerte Venenverweilkanüle der Größe 20 Gauge. Am Luer-Lock-Anschluss wurde seitlich ein Loch gebohrt, passend für die Messsonde des Mikrokapnometers. Nach erfolgreicher Intubation wurde der Tubus an einen Kleintier-Respirator angeschlossen und mit einem Gemisch aus Raumluft (70%) und Sauerstoff (30%) beatmet.

Zur Antagonisierung der Narkose am Ende der Operation wurde ein Gemisch aus Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Naloxon (1,2 mg/kg) s.c. appliziert. Zur Flüssigkeitssubstitution während der SAB-Induktion wurden außerdem 0,2 ml körperwarmer isotonischer Kochsalzlösung s.c. injiziert. Postoperativ wurden die Tiere täglich mit Carprofen

(4 mg/kg s.c.) analgetisch versorgt, sowie mit 0,2 ml isotonischer Kochsalzlösung s.c. substituiert.

2.3.5 Intraoperatives Monitoring

Die im Folgenden beschriebenen Parameter wie Körpertemperatur, Beatmungsparameter (Atemfrequenz, endtidaler Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$)), intrakranieller Druck (ICP) und lokale zerebrale Durchblutung (rCBF) wurden während der gesamten Operation zur SAB-Induktion, sowie bis 20 Minuten danach kontinuierlich gemessen und über das Software-Programm LabChart (Labchart 7 und Labchart Reader, ADInstruments, Dunedin, New Zealand) aufgezeichnet.

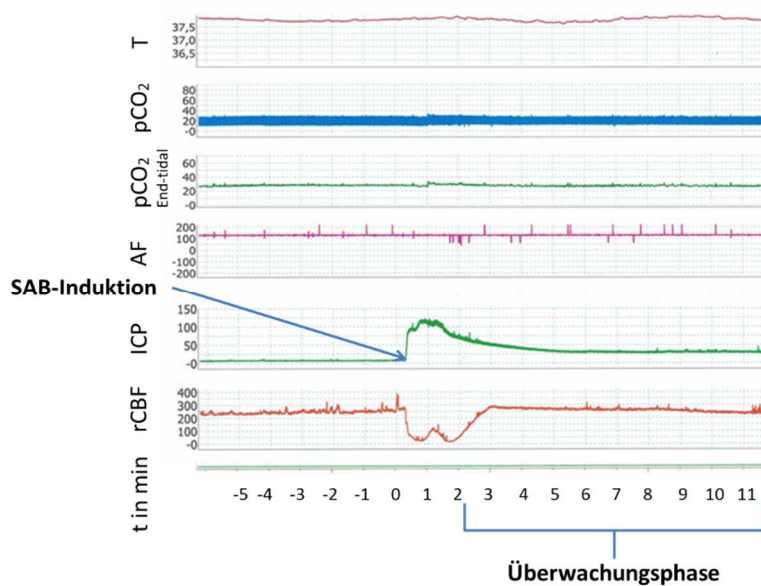


Abbildung 7. Monitoring mit Labchart. Das Bild zeigt einen modifizierten Screenshot einer mit Labchart aufgenommenen SAB-Operation. Der grüne Graph zeigt den Verlauf des ICP-Wertes mit plötzlichem Anstieg unmittelbar nach SAB-Induktion (blauer Pfeil). Der rote Graph stellt den spiegelverkehrten Verlauf des LDF-Graphen, mit einem starken Abfall direkt

nach der SAB. Weiterhin sind hier die wenig verändernden Parameter wie Körpertemperatur (T), endtidaler Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$), Atemfrequenz (AF) und die Überwachungsphase nach der SAB dargestellt.

Messung der Körpertemperatur

Nach Einleitung der Narkose wurde die Maus auf eine rückgekoppelte Heizmatte gelagert und eine Temperaturmesssonde rektal eingeführt. Die Messsonde wurde mit einem Temperaturregler, der über die Temperatur der Heizmatte die Körpertemperatur des Tieres bei 37°C konstant hielt, verbunden. Auf diese Weise wurde eine Auskühlung des Tieres während der Narkose verhindert.

Kapnometrie

Zur Beurteilung der erfolgreichen endotrachealen Intubation und ihrer Erhaltung während der gesamten OP, sowie zur Abschätzung des CO_2 -Spiegels in der arteriellen Blutgasanalyse wurde der endtidale pCO_2 direkt nach der Intubation sowie während des gesamten Eingriffs überwacht.

Ziel war es, einen endexpiratorischen pCO_2 von 35-45 mmHg zu erreichen, was über die Regulation der Ventilationsfrequenz mit dem Sauerstoff-/Luftgemisch geschah. Die Atemfrequenz betrug dabei ca. 120-180 Atemzüge pro Minute, das Atemzugvolumen betrug 200-250 μl .

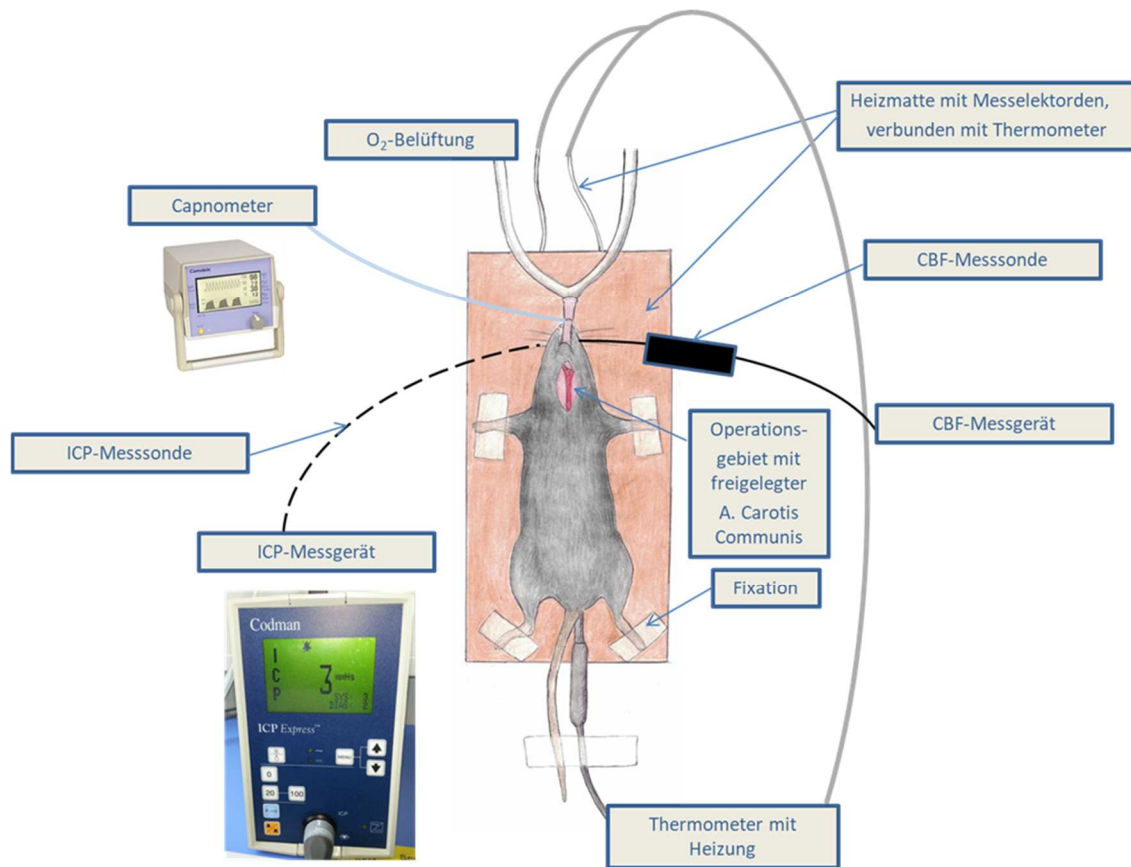


Abbildung 8. Versuchsaufbau. Schematische Darstellung des OP-Platzes für die SAB-Induktion. Die Maus ist auf der Heizmatte, die mit dem rektalen Thermometer verbunden ist, platziert. Die Maus ist intubiert, der rosa Tubus ist an die mechanische Ventilation und an den Kapnometer angeschlossen. Links befindet sich die ICP-Messsonde, angeschlossen an das ICP-Messgerät. Rechts befindet sich die LDF (Laser-Doppler Fluxmetrie) - Sonde zur Messung für den lokalen zerebralen Blutfluss, angeschlossen an das entsprechende Messgerät. Im Halsbereich des Tieres ist die Präparation der A. carotis communis dargestellt.

Messung des intrakraniellen Drucks (ICP)

Zur Überwachung des intrakraniellen Drucks (ICP), dessen Anstieg als zuverlässiger Indikator für eine erfolgreich induzierte SAB beschrieben wurde (129), wurde eine ICP-Messsonde zwischen Schädelkalotte und Dura mater der Maus angebracht. Dazu wurde die Maus in Bauchlage mit einer Nasenklemme fixiert. Mit einer kleinen Schere wurde ein ca. 0,7 cm langer Hautschnitt zwischen rechtem Ohr und kurz vor dem rechten Auge durchgeführt. Der mediale Teil des rechten M. Temporalis wurde mit dem Skalpell von der Schädelkalotte scharf abgetrennt und stumpf nach rechts präpariert. Am kaudalen Teil des Os Temporale, mit ca. 2 mm Abstand zur durchschimmernden A. cerebri media, wurde ein ca. 4 mm großes Bohrloch in die Schädelkalotte gefräst. Im Anschluss wurde der ca. 5 mm lange, reisförmige Messkopf der ICP-Sonde epidural über dem rechten Kortex eingebracht, mit Knochenzement fixiert und die Sonde mit dem ICP-Monitor verbunden. Dieser Monitor liefert mit einer Auflösung von 1 Hz den gemessenen Hirndruck in mmHg. In Ruhe werden Hirndruckwerte zwischen 0-7 mmHg gemessen. Bei der Auslösung der SAB kommt es zu einem starken Anstieg des Hirndrucks auf 60-130 mmHg. Tiere, bei denen kein Anstieg des Hirndrucks über 60 mmHg beobachtet werden konnte, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen und nicht ausgewertet. Während der 20-minütigen Überwachungsphase nach SAB-Induktion fällt der ICP in der Regel auf Werte zwischen 20-25 mmHg zurück. Ein erneuter Anstieg des ICP Wertes in der Überwachungsphase auf mehr als 50% des Endwertes unmittelbar nach der SAB Induktion wurde als eine Nachblutung definiert und entsprechend ausgewertet.

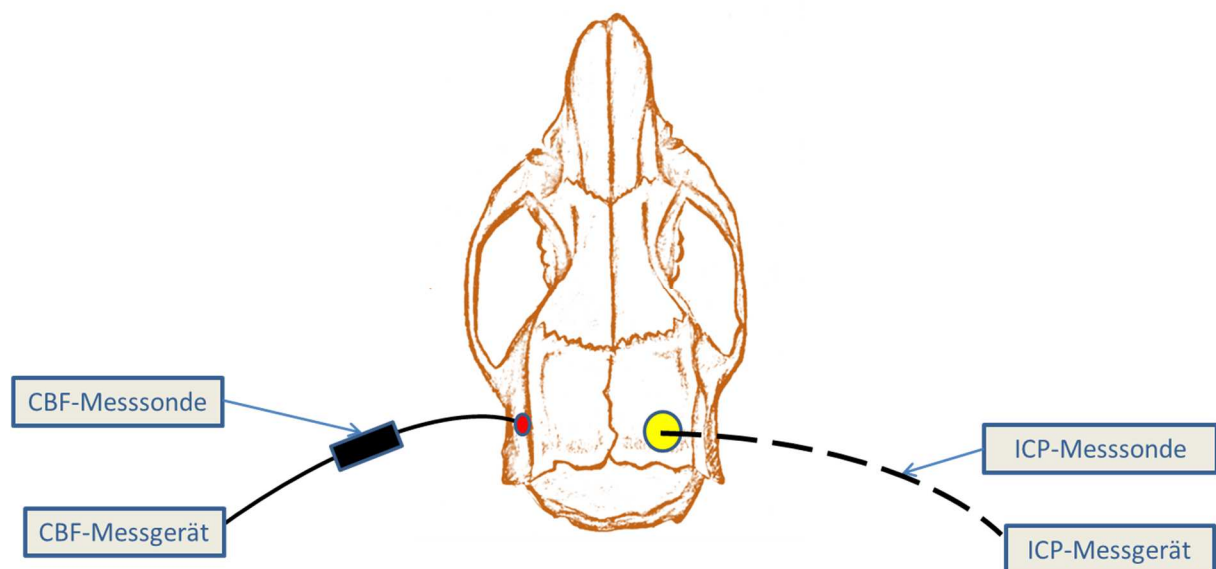


Abbildung 9. Mausschädel. Schematische Darstellung eines murinen Schädels mit Ort der Trepanation (gelb) für die Platzierung der ICP-Messsonde und Ansatzpunkt der CBF-Messsonde (rot).

Messung der regionalen zerebralen Durchblutung (rCBF)

Neben dem Hirndruckanstieg zeigt sich bei einer SAB zeitgleich ein plötzlicher Abfall der regionalen zerebralen Durchblutung (rCBF). Die Werte fallen dabei schlagartig auf etwa 15% des Ausgangswertes (100%) und erholen sich nach einigen Minuten auf ca. 80% desselben wieder. Der rCBF-Abfall liefert neben dem ICP-Anstieg einen wichtigen Hinweis auf eine erfolgreich induzierte SAB (129). Zur Platzierung der Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)-Sonde wurde ein ca. 0,7 cm langer Hautschnitt links zwischen dem Ohr und dem Auge der Maus durchgeführt. Der linke M. Temporalis wurde medial von der Schädelkalotte mit einem Skalpell scharf abgetrennt und auf die linke Seite geschoben. Der seitliche Teil des linken Os Temporale wurde so freigelegt und dort die LDF-Sonde über dem Flussgebiet der A. cerebri media angelegt. Anschließend wurde die Sonde mit einem Zweikomponentenkleber fixiert, an die Fluximetrie angeschlossen und die regionale zerebrale Durchblutung gemessen.

2.3.6 Induktion der SAB

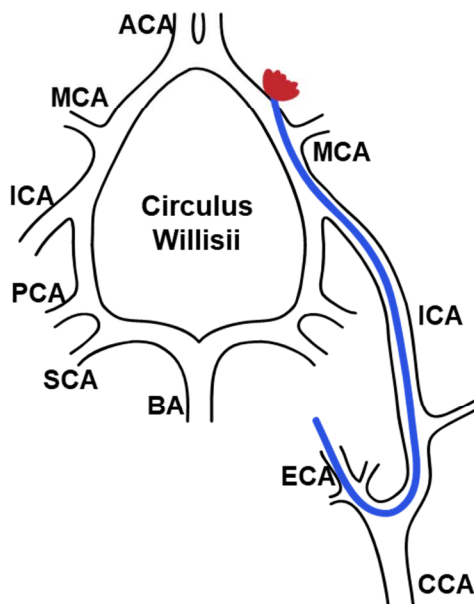
Für die Induktion der SAB bei der Maus wurde das in unserem Labor etablierte Filament-Modell angewendet (128).

Dabei führt man eine endovaskuläre Perforation des vorderen Anteils des Circulus Willisii mittels eines Filaments durch. In diesem Areal sind auch beim Menschen die meisten intrakraniellen Aneurysmen, deren Ruptur eine SAB auslösen können, lokalisiert (2).

Die Maus wurde nach Präparation der ICP- und LDF-Sonden auf den Rücken gelagert und an der Heizmatte fixiert. Die Operation erfolgte unter Mikroskopsicht. Zwischen dem Sternum (Manubrium sterni) und der Mandibula des Tieres wurde ein ca. 2,5 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Die Speicheldrüsen und das Unterhautfettgewebe wurden median stumpf durchtrennt und lateralisiert. Die nun sichtbare linke A. carotis communis und deren Bifurkation in A. carotis interna und A. carotis externa, die sogenannte Carotis-Gabel, wurde freipräpariert. Der parallel verlaufende N. Vagus wurde ebenfalls dargestellt, um eine spätere Durchtrennung zu vermeiden. Die A. carotis externa wurde anschließend möglichst kranial der Bifurkation mit einem Hautfaden ligiert. Zusätzlich wurde weiter kaudal ein zweiter Ligaturfaden vorgelegt, aber nicht ligiert. Im Anschluss wurden die A. carotis communis möglichst kaudal und die A. carotis interna, einschließlich der A. thyroidea, möglichst kranial mit je einem Mikroclip temporär verschlossen, sodass die Carotis-Gabel in allen drei Richtungen okkludiert war. Mit einer Gefäßschere wurde in die A. carotis externa zwischen Ligatur und vorgelegtem Fadenknoten eine ca. 0,5 mm lange Inzision gesetzt. Über diese kleine Gefäßöffnung wurde anschließend ein 2,5 cm langes Filament bis zur A. carotis communis vorgeschoben und mit

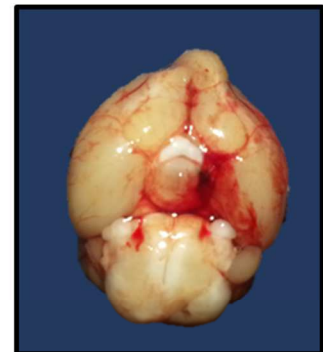
der vorgelegten Ligatur verschlossen. Danach wurde die A. carotis externa auf der Höhe der Inzision durchtrennt. Der Gefäßstumpf der A. carotis externa einschließlich des darin fixierten Filaments wurde nach kaudal verlagert und das Filament dabei in die A. carotis externa bis zum Mikroclip vorgeschoben. Beide Mikroclips, lokalisiert an der A. carotis externa und an der A. carotis communis, wurden entfernt und das Filament in die A. carotis interna vorsichtig bis zum plötzlichen Anstieg des ICP vorgeschoben. Ein ICP-Anstieg über 60 mmHg diente als Beweis für eine korrekt indizierte SAB. Sofort danach wurde das Filament wieder zurückgezogen und der Gefäßstumpf der A. carotis externa ligiert. Abschließend wurde die Wunde mit einem Faden mit ca. fünf Stichen verschlossen.

a **Circulus Willisii Perforation
mit Prolene 5-0 Faden**



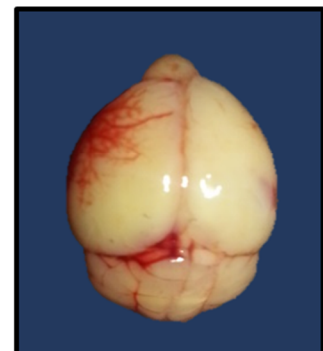
Modifiziert aus Schüller K. et al. J Vis Exp. 2013

b



**Mausgehirn nach SAB,
basale Ansicht**

c



**Mausgehirn nach SAB,
kortikale Ansicht**

Abbildung 10. Intravasale SAB - Induktion am Mausmodell. **a)** Schematisch dargestellt ist die Durchführung der intraluminalen SAB-Induktion mit einem Prolene-Faden (blau). Der Zugang erfolgt über die A. carotis communis (CCA) in die A. carotis interna (ICA) und von dort aus wird der Circulus Willisii erreicht. Dieser wird in seinem vorderen Bereich mit dem Faden durchstossen und auf diese Weise eine SAB ausgelöst. ACA: A. cerebri anterior, MCA: A. cerebri media, ECA: A. carotis externa, PCA: A. cerebri posterior, SCA: A. superior cerebelli, BA: A. basilaris. **b)** Mausgehirn nach einer SAB von kaudal mit einem perforierten Circulus Willisii (rechts). **c)** Mausgehirn nach einer SAB von kranial.

Nach Induktion der SAB wurde die Maus noch für die folgenden 20 Minuten in Narkose gemonitort, um etwaige Nachblutungen oder andere physiologische Auffälligkeiten zu registrieren. Anschließend wurden die LDF- und die ICP-Sonden entfernt und die Wunden am Kopf vernäht sowie die Narkose mit einer Kombination aus Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Naloxon (1,2 mg/kg) s.c. antagonisiert. Sobald das Tier motorische Aktivität zeigte, wurde es extubiert und im Anschluss wurde das Tier postoperativ in einem auf eine Temperatur von 33°C beheizten Inkubator für 24 Stunden gehalten. Danach wurde es in seinen ursprünglichen Käfig umgesetzt.

2.3.7 Postoperative Beurteilung nach SAB

Neuroscores und Allgemeinzustand

Um den neurologischen Zustand der Mäuse nach SAB-Induktion beurteilen zu können, wurden neurologische Tests durchgeführt. Die Tests wurden bereits an den zwei beiden Tagen unmittelbar vor SAB-Induktion durchgeführt, um die Tiere mit den neurologischen Prüfungen vertraut zu machen und ggf. Tiere auszuschließen, die nicht in der Lage waren die Tests richtig auszuführen. Die Testergebnisse wurden als Ausgangswerte festgehalten. Am Tag der OP-Durchführung erfolgte zur Stressreduktion keine neurologische Testung. Postoperativ wurden die Tests täglich immer zu gleicher Tageszeit vom ersten bis zum siebten Tag post OP durchgeführt bzw. bis zum Zeitpunkt, an dem das Tier aus dem Versuch genommen wurde. Die neurologischen Tests wurden speziell an die neurologischen Schäden nach einer SAB adaptiert und erfolgten in fünf Kategorien (128). Dazu gehörten allgemeines Verhalten und Aufmerksamkeit, Hirnnervenstatus, Motorik, Koordination sowie modifiziertes Neuroscoring nach Bederson (128, 130). Der Hirnnervenstatus wurde anhand des Gehörs (Reaktion auf Händeklatschen) und Bewegung der Barthaare geprüft. Die Koordination wurde anhand der Fähigkeit, über Balken mit unterschiedlicher Breite (3, 2 und 1 cm) zu laufen, sowie durch den Bodengreiftest beurteilt. Die Motorik wurde anhand der jeweiligen Beweglichkeit der vier Pfoten evaluiert. Der Bederson-Test, ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der neurologischen Schäden an Nagern nach Schlaganfall (130), wurde hier von ursprünglich vereinfachten vier Bewertungspunkten (null bis drei) auf sechs (null bis fünf) erweitert. Dabei bedeuteten null Punkte kein neurologisches Defizit, ein Punkt entsprach einer milden Vorderbeinschwäche, zwei Punkte einer schweren Vorderbeinschwäche mit Neigung zur geschädigten Seite beim Ziehen am Schwanz, drei Punkte spontanes Kreisen oder Laufen zu der entgegengesetzten Seite, vier Punkte, wenn Bewegung nur nach Stimulation erfolgte und bei herabgesetztem Bewusstsein und fünf Punkte, wenn keine Antwort auf äußere Stimuli

sowie keine spontane Bewegung zu beobachten war. Ohne jegliches neurologische Defizit erhielt die Maus null Punkte, bei maximaler Schädigung konnten insgesamt 31 Punkte vergeben werden (siehe Tabelle 1).

Maus ID: 806	Tag -2	Tag -1	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Körpergewicht	25,1g	24,9g	25,0g	21,7g	20,0g	19,7g	20,1g	21,1g	22,5g	23,5g
Allg. Verhalten, Aufmerksamkeit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bewegung der Barthaare	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gehör	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vorderbeine: Linksbewegung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vorderbeine: Rechtsbewegung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hinterbeine: Linksbewegung	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Hinterbeine: Rechtsbewegung	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Balkengang 3 cm	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0
Balkengang 2 cm	1	1	0	2	2	1	1	1	1	0
Balkengang 1 cm	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1
Bodengreiftest	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mod. Bederson-Neuroscore	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
totale Punktzahl (0-31)	2	2	1	11	10	5	4	4	3	2

Modifiziert aus Buehler et al. Stroke 2015

Tabelle 1. Beispiel einer vollständigen Neuroscore-Erhebung und Körpergewichtserfassung beginnend zwei Tage vor der SAB-Induktion am Tag null.

Gewichtsverlauf

Eine hohe objektive Aussagekraft für das postoperative Allgemeinbefinden des Tieres hat sein Gewicht und damit seine Fähigkeit zur adäquaten postoperativen Nahrungsaufnahme (131). Die Messung des Körpergewichts erfolgte mit einer Präzisionswaage vor der Durchführung der neurologischen Testung, täglich zur gleichen Tageszeit über dem gesamten Versuchszeitraum.

2.3.8 Perfusion der Maus

Am siebten postoperativen Tag nach SAB-Induktion wurden die Mäuse zu Versuchsende transkardial perfundiert. Dazu wurden die Tiere in eine mit 4%igem Isofluran und 30%igem Sauerstoff gefüllte Narkose-Einleitungskammer für 90 Sekunden gebracht und anschließend mit 0,3 ml einer Mischung aus Fentanyl, Midazolam und Medetomidin i.p. (s.o.) narkotisiert. Nach Prüfung der Reflexausschaltung wurde die Maus an den Pfoten auf dem Rücken fixiert und der Brustkorb eröffnet. Die linke Herzkammer wurde mit einer Flügelkanüle punktiert und

der rechte Vorhof für den Blutaustritt inzidiert. Die anschließende Perfusion erfolgte von der linken Herzkammer aus zunächst mit 20 ml 0,9%iger Kochsalzlösung und sofort danach mit 20 ml 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) unter einem Druck von etwa 120 mmHg.

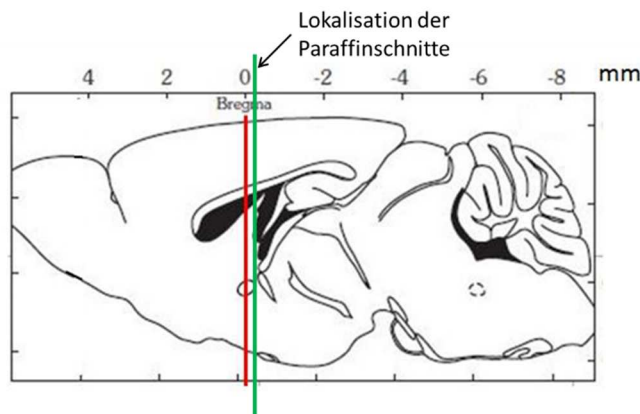
2.3.9 Histologie

Trepanation

Sofort nach der Perfusion wurde das Tier mit einer großen Schere dekapitiert. Die Kopfhaut wurde am Schädel entlang vom Nacken bis zur Nasenspitze aufgeschnitten und die Schädelkalotte entlang der Sagittalnaht durchtrennt. Die beiden Hälften des Schädelknochens konnten daraufhin aufgeklappt und das Gehirn nach der Durchtrennung der Bulbi Olfactorii entnommen werden. Für die darauffolgende Fixation wurden die Gehirne in einer 4%igen PFA-Lösung in PBS (pH 7,4) bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt.

Anfertigung von Paraffinschnitten

Nach der 24-stündigen PFA-Fixation wurden die Gehirne in spezielle Einbettkassetten überführt, für 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und in 70%igen Ethanol aufbewahrt. Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin wurden die Gehirne mit Hilfe eines Entwässerungskarussells in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (60 Minuten in 80% Ethanol, 60 Minuten in 95% Ethanol, 90 Minuten in 100% Ethanol). Als Intermedium zur Verdrängung des Alkohols diente Roti®Histol, einem Alternativprodukt zum Xylol, in dem die Gehirne für 120 Minuten inkubiert wurden. Danach wurden die Gewebe 24 Stunden lang in flüssigem Paraffinwachs bei einer Temperatur von 65°C gelagert. Im Anschluss wurden die Gehirne mithilfe einer Paraffinausgießstation in Blöcke gegossen und ausgehärtet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dünne Koronarschnitte hergestellt (siehe Abbildung 11). Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Thermoschrank bei 50°C getrocknet, um eine möglichst gute Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu erhalten.



Modifiziert aus Web. URL <<http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/>>, 15.06.19

Abbildung 11. Schematische Darstellung zur Lokalisation des Bregmas. Auf der Abbildung dargestellt ist das murine Gehirn in der mittleren sagittalen Ebene. Links befindet sich dabei der kraniale Gehirnteil und rechts der kaudale. Die Gesamtlänge eines Gehirns betrug ca. 16 mm. Mit einem roten Strich ist auf dem Bild die koronare Schnittebene von Bregma gekennzeichnet, mit dem grünen Strich ist die koronare Ebene

eingezeichnet, aus welcher die Entnahme der Paraffinschnitte erfolgte. Sie stammten somit aus ca. 1,46-1,70 mm-Entfernung hinter Bregma. Es wurden drei koronare Gehirnschnitte pro Tier im Abstand von 50 µm gefertigt.

Nissl-Färbung und Fixierung

Für die Kresylviolettfröbung nach Nissl wurden die Paraffinschnitte zunächst in Roti®Histol für zehn Minuten entparaffinisiert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert (je fünf Minuten in 100%, 95%, 80% und 70% Ethanol, sowie in destilliertem Wasser) und zehn Minuten mit Kresylviolett gefärbt. Danach wurden die Präparate entsprechend in aufsteigender Alkoholreihe (für je 20 Sekunden in destilliertem Wasser, 70%, 80% und 90% Ethanol sowie für fünf Minuten in 100% Ethanol) wieder entwässert und für weitere zehn Minuten in Roti-Histol entfettet. Abschließend wurden die Schnitte mit Roti®Histokitt II unter Deckgläsern eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

Mikroskopie

Das Mikroskopieren fand an einem speziell ausgestatteten Histologie-Mikroskop mit Kamerasystem statt. Es wurde mit bis zu einer 40-fachen Vergrößerung gearbeitet. Zur quantitativen Auswertung der weiter unten beschriebenen Parameter wurde das Software-Programm (AxioVision SE 64 Rel.4.9.1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) benutzt.

Beurteilung der neuronalen Vitalität anhand von Hippocampuszellen

Die neuronale Vitalität bzw. der neuronale Zelltod wurde in den Hippocampusregionen CA1-3 untersucht. Diese Regionen wurden mit Hilfe des Mikroskops auf den Nissl-gefärbten Gehirnschnitten aufgesucht und mit 40-facher Vergrößerung mit der Kamera aufgenommen.

Zur Auswertung wurden alle Aufnahmen gleich ausgerichtet und vier definierte Zählrahmen mit Hilfe der Software um die unterschiedlichen Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 platziert. Die Rahmen über den Regionen CA1a und CA2 wurden so gesetzt, dass die hippocampalen Neuronenstreifen diagonal darin zu Liegen kamen. Die Rahmen über den Regionen CA1b und CA3 wurden so positioniert, dass die Neuronen horizontal darin liegen (siehe Abbildung 12). Innerhalb dieses Rahmens wurden die untergegangenen Neurone mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (ImageJ 1,51 f) ausgezählt und die neuronale Vitalität auf diese Weise beurteilt. Die hippocampalen Neurone reagieren besonders empfindlich auf ischämische Schäden und eignen sich somit gut, um das Ausmaß des neuronalen Zelltodes zu evaluieren. Jede der vier Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 wurde auf jeweils drei Gehirnschnitten ausgezählt, daraus ein Mittelwert gebildet, und mit der jeweiligen Gegenseite verglichen.

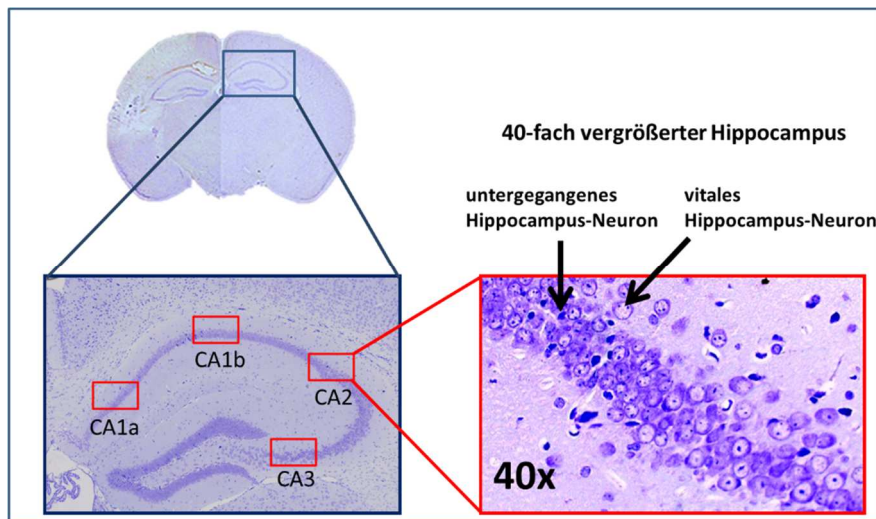


Abbildung 12.
Auswertung der neuronalen Vitalität im Hippocampus nach SAB. Links oben auf der Abbildung ist ein muriner Nissl-gefärbter koronarer Gehirnschnitt gezeigt. Die hier dargestellte koronare Ebene befindet sich ca. 1,5 mm hinter Bregma.

Links unten auf dem Bild ist der linke Hippocampus mit den vier Zählfenstern in den hippocampalen Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 dargestellt. Rechts unten ist der 40-fach vergrößerte Hippocampus mit einem untergegangenen und einem vitalen Beispielsneuron (schwarze Pfeile) gezeigt.

Beurteilung des Hydrozephalus

Um das Ausmaß des Hydrozephalus zu evaluieren, wurden von jedem Mausgehirn beginnend 0,14 mm vor dem Bregma drei koronare Gehirnschnitte im Abstand von jeweils 100 µm angefertigt (siehe Abbildung 11). Auf jedem dieser Koronarschnitte wurden die Flächen der beiden Seitenventrikel bestimmt, addiert und ins Verhältnis zur gesamten Gehirnfläche gesetzt. Aus den drei so berechneten Werten für jede Seite (rechts und links) wurde jeweils ein Mittelwert bestimmt (siehe Abbildung 13).

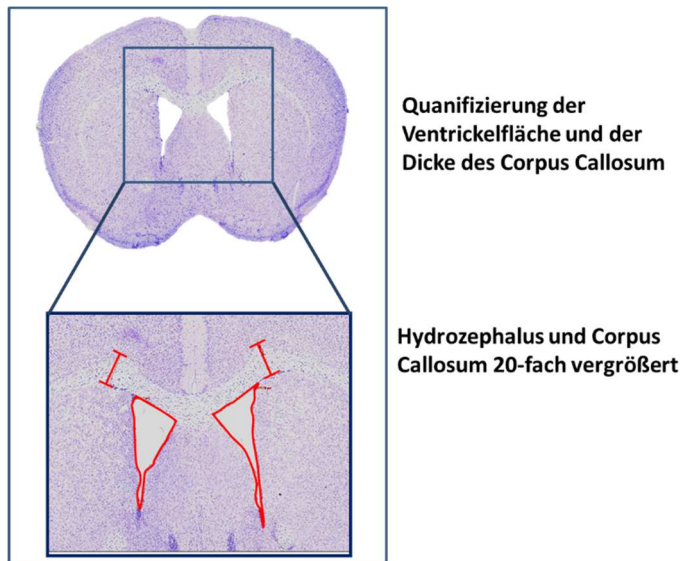


Abbildung 13. Quantifizierung des Hydrozephalus und der Dicke des Corpus Callosum. Um den Hydrozephalus zu bestimmen, wurden zunächst die beiden Seitenventrikel aufgesucht und ihre Fläche ausgemessen (rote Dreiecke). Zur Messung der Dicke des Corpus Callosum wurde der am weitesten dorsal gelegene Punkt desselben jeweils in der rechten und in der linken Gehirnhemisphäre aufgesucht und von dort aus ein Lot zu seinem frontalen Ende gefällt (rote Balken).

Beurteilung der Schädigung der weissen Substanz anhand des Corpus Callosum

Zur Quantifizierung der Schädigung der weissen Substanz wurden dieselben drei Gehirnschnitte verwendet, die auch für die Messung des Hydrozephalus herangezogen wurden - beginnend 0,14 mm vor dem Bregma, jeweils in 100 µm Abstand. Diese Dicken des Corpus Callosum wurden beidseits auf den drei koronaren Gehirnschnitten gemessen und für jede Seite wurde ein Mittelwert aus den drei Messungen ermittelt (siehe Abbildung 13).

2.4 Versuchsgruppen und experimentelles Design

Es wurden drei Versuchsgruppen von Tieren untersucht (Versuchsgruppe 1, 2 und 3). Jede Gruppe bestand jeweils aus den endothelialen Gpx4 Knockout-Tieren ($Gpx4^{iEKO}$) und den wildtypischen Geschwistertieren ($Gpx4^{iECWT}$) als Kontrollen, insgesamt ergaben sich also sechs Untergruppen.

Zunächst erfolgte in allen Versuchs- und Kontrollgruppen die Knockout-Induktion mit Tamoxifen im Alter von drei bis vier Wochen. Die ersten zwei Versuchsgruppen (Versuchsgruppe 1 und 2) erhielten bis zur SAB-Induktion drei bis fünf Wochen lang (Versuchsgruppe 1) bzw. über sechs bis sieben Monate (Versuchsgruppe 2) die normale Maus-Standarddiät mit einem Vitamin E-Gehalt von 120 mg/kg. Versuchsgruppe 3 dagegen bekam nach der Knockout-Induktion mit Tamoxifen für drei bis fünf Wochen lang eine Vitamin-E-Mangeldiät, die nur 7 mg/kg Vitamin E enthielt.

Bei allen Tieren wurde eine SAB ausgelöst. Um die Effektivität und die Richtigkeit der SAB-Durchführung zu überprüfen, sowie die Tiere am Leben zu erhalten, wurden sie intraoperativ

gemonitort und die ermittelten Werte kontinuierlich aufgezeichnet: intrakranieller Hirndruck (ICP), regionale zerebrale Durchblutung (rCBF), endtidaler $p\text{CO}_2$, sowie Körpertemperatur (T). Zwei Tage vor SAB-Induktion sowie sieben Tage postoperativ, bevor das Experiment beendet wurde, wurden die Tiere täglich gewogen und auf ihre neurologische Funktion getestet. Nach sieben Tagen nach Induktion der SAB wurden die Tiere perfundiert und die Mäusegehirne histologisch aufbereitet und analysiert. Zu jeder Zeit wurde die Mortalität registriert, falls die Tiere vor der Beendigung des Experiments am siebten postoperativen Tag aus dem Versuch genommen wurden. Alle postoperativen Untersuchungen dienten der Beurteilung des Outcomes nach SAB.

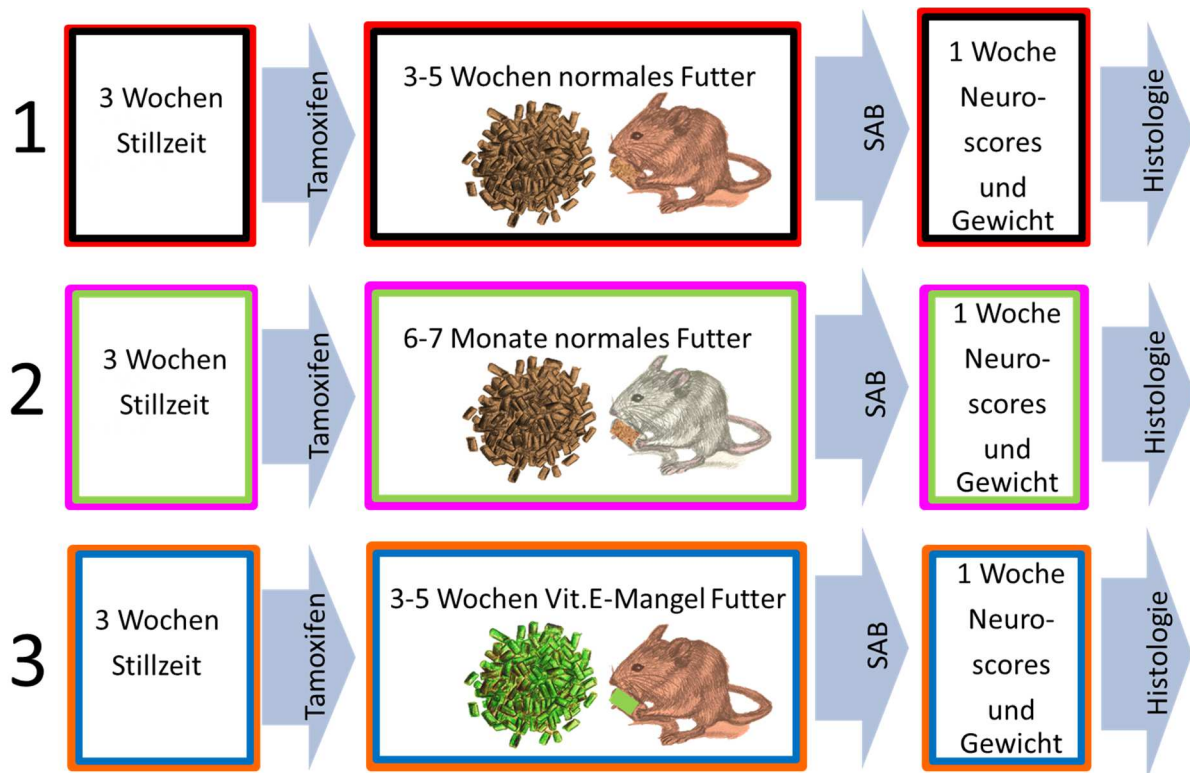


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Versuchsgruppen und chronologischer Verlauf.

Nach der dreiwöchigen Säugezeit erfolgte die Tamoxifen-Applikation zur Knockout-Induktion, danach wurden die Tiere entweder mit normalem (braun) oder Vitamin-E-Mangel-Futter (grün) gefüttert. Im Anschluss erfolgte bei allen Versuchsgruppen die SAB-Induktion, wonach eine Woche lang Neuroscores und Gewicht registriert wurden. Schließlich erfolgte die histologische Analyse der entnommenen Gehirne.

Versuchsgruppe 1 sollte einen möglichen Unterschied beim Outcome nach SAB zwischen Tieren ohne funktionale Gpx4 in den Endothelzellen und Tieren mit funktionaler endothelialer Gpx4 detektieren. Nachdem in der Versuchsgruppe 1 kein signifikanter Unterschied zwischen

Knockout- und Kontrolltieren festgestellt werden konnte, wurden Versuchsgruppen 2 und 3 konzipiert. In beiden Versuchsgruppen sollte zusätzlicher oxidativer Stress einen möglichen Unterschied zwischen Mäusen mit dysfunktionaler und funktionaler endothelialer Gpx4 aufdecken. In Versuchsgruppe 2 wurden wesentlich ältere Tiere für die SAB verwendet, in Versuchsgruppe 3 dagegen Versuchstiere, die vor SAB-Induktion Vitamin E gemangelt wurden.

Zum Schluss wurde Versuchsgruppe 1 jeweils mit Versuchsgruppe 2 und 3 in den Outcome-bestimmenden Parametern wie Neuroscores, Gewicht, Überleben und organischer neuronaler Schaden miteinander verglichen.

Alle Versuchsgruppen enthielten im ungefähren Verhältnis von 1:1 männliche und weibliche Tiere.

Versuchsgruppen	Gpx4 ^{iECWT}	Gpx4 ^{iECKO}
1	6-8 Wochen alt n=9	6-8 Wochen alt n=8
2	6-8 Monate alt n=10	6-8 Monate alt n=11
3	Vit.E-Mangel-Tiere n=11	Vit.E-Mangel-Tiere n=13

Tabelle 2. Übersicht über die Versuchsgruppen.

Die Tabelle zeigt die drei Versuchsgruppen mit den Wildtyp (iECWT)- und Knock-Out (iECKO)-Tieren sowie ihr jeweiliges Alter und Gruppengröße (n).

2.5 Statistische Datenauswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaPlot 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland), sowie mit Excel 2010 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) ausgewertet. Die Graphen wurden mit SigmaPlot erstellt. Die Datenauswertung erfolgte mit der one-way-ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis-Test) sowie der two-way ANOVA on Ranks Varianzanalyse. Der Wilcoxon-Signed-rank-Test diente für Vergleiche innerhalb einer Gruppe sowie der Student-Newman-Keuls-Test bei Mehrfachvergleichen. Das Überleben wurde mit dem survival LogRank-Test und mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet.

Ab einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Werte als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

Für die Beantwortung der Fragestellung, ob und in wie weit der Funktionsverlust von Gpx4 im Endothel einen (negativen) Einfluss auf das Outcome nach SAB hat, wurden die induzierbaren endothelialen Gpx4 Knockout-Mäuse (Gpx4^{IECKO}) und die Kontroll-Geschwistertiere (Gpx4^{IECWT}) vor SAB-Induktion mit Tamoxifen behandelt, um den Knockout auszulösen. Die SAB-Induktion erfolgte frühestens drei Wochen nach Tamoxifen-Applikation, um sicherzustellen, dass das Gpx4-Protein zum Zeitpunkt der SAB in den Knockout-Tieren abgebaut worden war und um mögliche Nebeneffekte durch das verabreichte Tamoxifen auszuschließen.

Wie bereits beschrieben, wurden drei Versuchsgruppen untersucht: Gpx4^{IECKO} und Gpx4^{IECWT} im Alter von sechs bis acht Wochen (Versuchsgruppe 1) bzw. sechs bis acht Monate (Versuchsgruppe 2), sowie Gpx4^{IECKO} und Gpx4^{IECWT} im Alter von sechs bis acht Wochen, die vor SAB-Induktion für drei bis fünf Wochen mit einem Vitamin E-armen Futter gefüttert worden sind (Versuchsgruppe 3). Zur besseren Übersichtlichkeit wurde den verschiedenen Gruppen eine eigene Farbe zugeordnet. In Versuchsgruppe 1 erhielten Gpx4^{IECWT}-Tiere die Farbe **schwarz** und Gpx4^{IECKO}-Tiere die Farbe **dunkelrot**. Die Versuchsgruppe 2 erhielt entsprechend die Farben **lila** (Gpx4^{IECKO}) und **grün** (Gpx4^{IECKO}) sowie Versuchsgruppe 3 die Farben **orange** (Gpx4^{IECWT}) und **blau** (Gpx4^{IECKO}).

Bei allen Gruppen wurde die Operation zur experimentellen Induktion einer SAB durchgeführt. Während der OP wurden die Tiere intensiv überwacht und die verschiedenen Parameter aufgezeichnet (siehe unten). Nach der SAB wurden die Tiere für sieben Tage beobachtet und täglich auf Überleben, Körpergewicht und neurologische Defizite untersucht. Am siebten postoperativen Tag wurden die Mäuse perfundiert, die Gehirne entnommen und für die histologische Auswertung aufbereitet. Somit lassen sich die erhobenen Daten in drei Kategorien unterteilen - intraoperative, perioperative und postoperative Daten:

1. **Intraoperative Daten:** Daten, die während der SAB-OP erhoben wurden.

Die verschiedenen Messparameter wurden über einen Zeitraum von insgesamt 20 Minuten erhoben, beginnend fünf Minuten vor bis 15 Minuten nach SAB-Induktion, wobei die SAB zum Zeitpunkt null ausgelöst wurde. Pro Minute wurden vier Werte (alle 15 Sekunden) aufgezeichnet und über den Messzeitraum somit insgesamt 80 Werte.

Erhoben wurden folgende intraoperativen Parameter:

1. **Intrakranieller Druck (ICP)**
2. **Regionale zerebrale Durchblutung (rCBF)**
3. **Endtidaler Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)**
4. **Körpertemperatur**

Die SAB-Induktion galt als erfolgreich, wenn der ICP-Wert den Wert von 60 mmHg überstieg. Im Ruhezustand, vor Auslösung der SAB, betrug der ICP-Wert ca. 1-7 mmHg. Der Peak des ICP-Anstiegs liegt definitionsgemäß stets über dem Zeitpunkt null, dem Zeitpunkt der SAB-Induktion.

2. **Perioperative Daten:** Parameter, die zwei Tage vor bis sieben Tage nach der SAB-OP erhoben wurden. Es wurden folgende Parameter dokumentiert:

1. ***Körpergewicht***
2. ***Neurologische Funktionen***
3. ***Überleben***

Um die Mäuse an die neurologischen Tests zu gewöhnen, wurden diese bereits zwei Tage vor der OP mit den Tests vertraut gemacht und trainiert. Postoperativ wurden die Tests täglich durchgeführt bis zum Versuchsende am siebten postoperativen Tag. Am Tag der SAB-OP wurden die neurologischen Tests nicht durchgeführt, um die Tiere vor der OP keinem unnötigen Stress auszusetzen bzw. ihnen nach der OP die nötige Erholungsphase zu gewähren. Tiere, die vorzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten, wurden schmerzlos durch zervikale Dislokation getötet.

3. **Postoperative Daten:** histologische Daten, die aus den entnommenen Gehirnen am siebten postoperativen Tag nach SAB-Induktion gewonnen wurden. Erhoben wurden folgende histologische Parameter:

1. ***Neuronaler Zellschaden im Hippocampus (ipsi- versus kontralateral), in allen Versuchsgruppen***
2. ***Hydrozephalusmessung, in den Versuchsgruppen 1 und 3***
3. ***Schädigung der weißen Substanz durch Bestimmung der Dicke des Corpus Callosum (ipsi- versus kontralateral), in den Versuchsgruppen 1 und 3***

Die histologischen Analysen wurden bei den Tieren durchgeführt, die am siebten postoperativen Tag perfundiert wurden. Für Tiere, die vorzeitig aus dem Versuch genommen wurden, wurden keine histologischen Daten erhoben.

Die Parameter Hydrozephalus und Corpus Callosum wurden nur von den Versuchsgruppen 1 und 3 erhoben (nicht von der Versuchsgruppe 2).

Als ipsilateral wird die Gehirnhälfte bezeichnet, auf dessen Seite die A. cerebri media perforiert wurde.

Intraoperativ 5 min vor und 15 min lang nach SAB	Perioperativ 2 Tage vor und 7 Tage nach SAB	Postoperativ 7 Tage nach SAB
ICP	Neuroscores	Hippocampus-Zellzahlen
rCBF	Körpergewicht	Corpus Callosum
Endtidales pCO ₂	Überleben	Hydrozephalus
Körpertemperatur		

Tabelle 3. Übersicht der Messparameter. In der Tabelle sind die erhobenen Messparameter nach dem Zeitpunkt ihrer Erhebung (intra-, peri- und postoperativ) zusammengefasst.

3.1 Versuchsgruppe 1: SAB bei Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO}-Tieren im Alter von sechs bis acht Wochen

Vor Induktion der SAB wurden die Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} direkt nach dem Absetzen im Alter von drei bis vier Wochen mit Tamoxifen behandelt, um den Knockout auszulösen. Anschließend, im Alter von sechs bis acht Wochen, wurde die SAB-Induktion durchgeführt. Es wurden insgesamt 17 Versuchstiere, neun **Gpx4^{IECWT}** und **acht Gpx4^{IECKO}** operiert.

3.1.1 Intraoperative Parameter

Abbildung 15 a-f. Zusammenstellung der intraoperativ erhobenen Daten. Abgebildet sind die während einer SAB-Induktion erhobenen physiologischen Parameter der Versuchsgruppe 1. Die Daten wurden fünf Minuten vor bis 15 Minuten nach SAB-Induktion aufgezeichnet. Gpx4^{IECWT} sind in Schwarz dargestellt und Gpx4^{IECKO} in Rot.

Intrakranieller Druck (ICP)

Die Aufzeichnung des intrakraniellen Drucks sollte den Nachweis für das Auslösen einer SAB erbringen und diente somit als Erfolgskontrolle. Der ursprüngliche ICP-Wert in Ruhe betrug bei den Wildtyp-Tieren **8,3 ± 1,1 mmHg** und bei den Knock-Out-Tieren **6,0 ± 0,8 mmHg**. Der ICP-Wert am Zeitpunkt null, also direkt bei Perforation des vorderen Circulus Willisii, stieg bei

den Wildtyp-Tieren auf $68,6 \pm 6,0$ mmHg und bei den Knockout-Tieren auf $58,2 \pm 7,1$ mmHg. Der ICP-Wert stieg dabei bei SAB-Induktion innerhalb von wenigen Sekunden steil an und flachte nach ca. 4-5 Minuten auf einen etwa dreifach höheren Wert als in Ruhe auf $20,36 \pm 1,48$ mmHg bei den Wildtyp-Tieren und auf $18,8 \pm 2,5$ mmHg bei den Knockout-Tieren ab. Die ICP-Werte wurden alle 15 Sekunden aufgezeichnet.

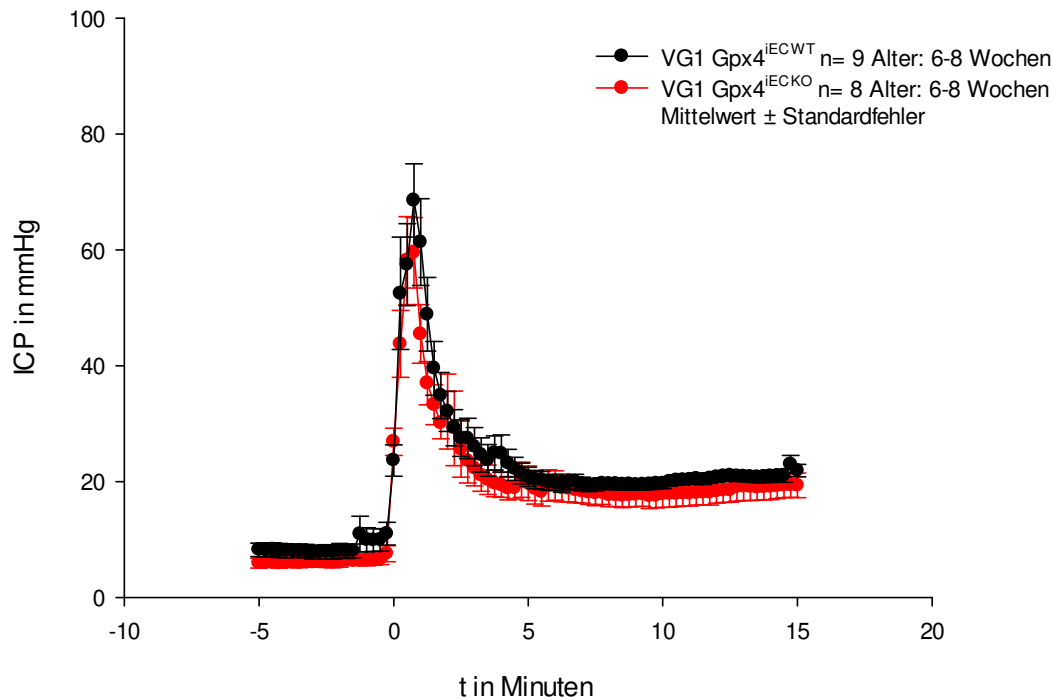


Abbildung 15 a.) Darstellung der ICP-Werte der Versuchsgruppe 1 mit einem deutlichen Peak bei SAB-Induktion zum Zeitpunkt null. Sowohl bei den Gpx4^{IECWT}- als auch bei den Gpx4^{IECKO}- Mäusen konnte erfolgreich eine SAB ausgelöst werden.

Nachblutungen

In einigen Fällen traten Nachblutungen innerhalb von fünf bis 15 Minuten nach der SAB-Induktion auf, die durch weitere, kleinere ICP-Anstiege registriert wurden. Diese Fälle waren zumeist im weiteren postoperativen Verlauf mit einem deutlich schlechteren Outcome und häufig mit einem vorzeitigen Versuchsabbruch verbunden. In der Versuchsgruppe 1 hatten von den neun Wildtyp-Tieren zwei Tiere eine Nachblutung, was $0,22 \pm 0,14$ Nachblutung pro Tier entsprach. Von den acht Knockout-Tieren hatten ebenfalls zwei Tiere eine Nachblutung, was $0,25 \pm 0,15$ Nachblutung pro Tier entsprach. Dies entsprach einer **22%**igen Nachblutungsrate bei den Wildtyp-Tieren und einer **25%**igen bei den Knockout-Tieren. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Mäusen.

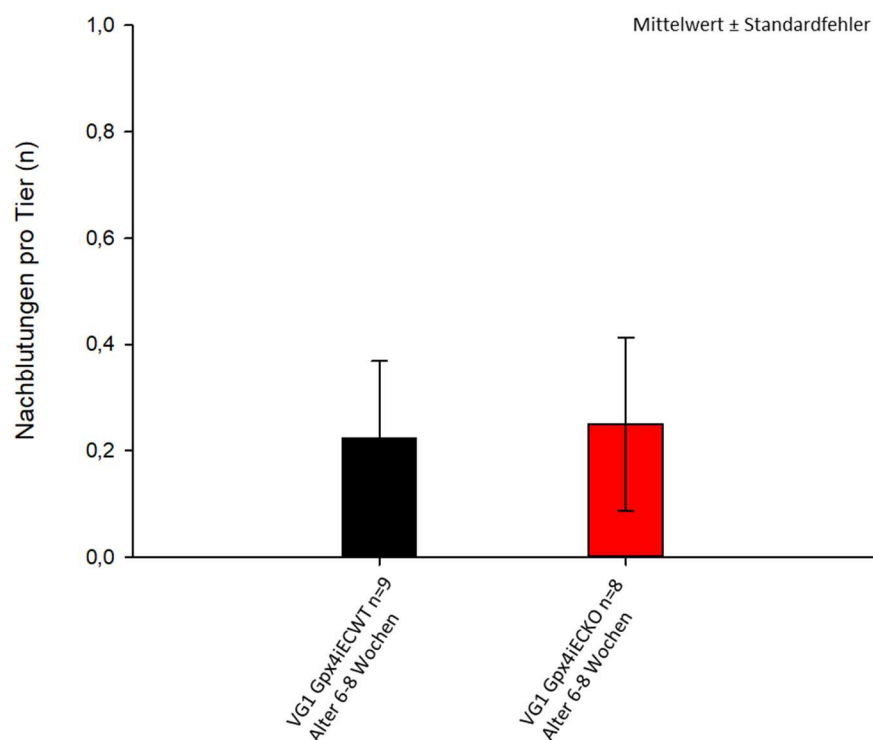


Abbildung 15 b.) Darstellung der Nachblutungen pro Tier der Versuchsgruppe 1. Der beobachtete Unterschied in den Nachblutungen zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} zeigte sich als statistisch nicht signifikant.

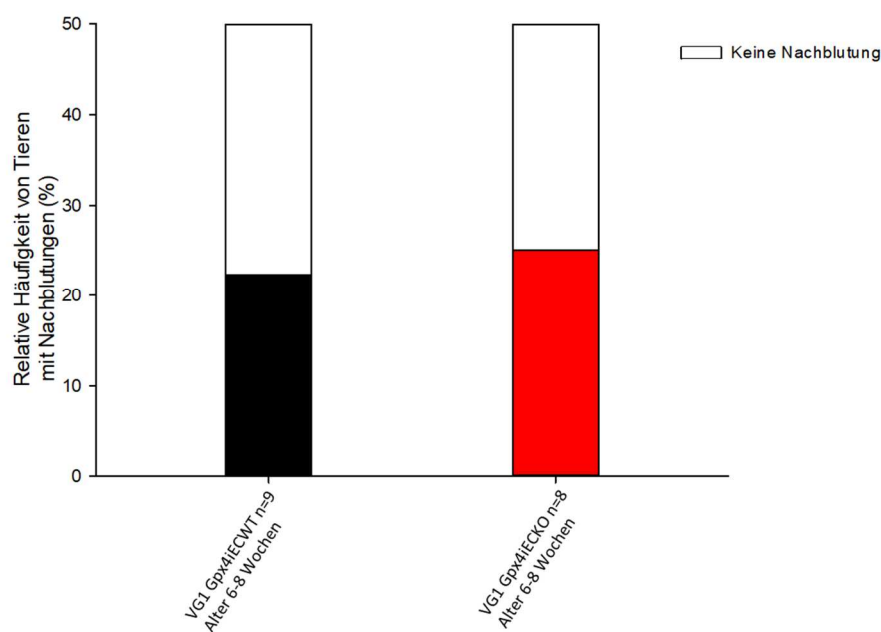


Abbildung 15 c.) Darstellung der relativen Häufigkeit von Tieren mit Nachblutungen der Versuchsgruppe 1.

Regionale zerebrale Durchblutung (rCBF)

Die regionale zerebrale Durchblutung, gemessen mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF), diente ebenso wie der ICP-Wert der Verifizierung der erfolgreich ausgelösten SAB. Im Gegensatz zu den ICP-Werten wurden hier nicht die absoluten Werte, sondern die prozentuale Änderung der rCBF-Werte alle 15 Sekunden registriert, da die Ausgangswerte des rCBF je nach Position der LDF-Sonde am Schädel und über dem Flussgebiet der A. cerebri media präparationsbedingt deutliche Unterschiede aufwiesen. Im Falle einer erfolgreich ausgelösten SAB zeigte der rCBF einen starken Abfall. Der ursprüngliche rCBF-Wert wurde als 100% definiert und fiel bei SAB-Induktion auf $37,2 \pm 7,3\%$ bei den Wildtyp-Tieren und auf $50,7 \pm 9,7\%$ bei den Knockout-Tieren ab. Dies sprach für eine erfolgreich durchgeführte SAB-Induktion. In den nächsten 3-4 Minuten nach SAB stieg der rCBF wieder auf knapp unterhalb des Ausgangswerts, um anschließend wieder etwas abzuflachen und verblieb schließlich bei Werten von $68,1 \pm 8,2\%$ bei den Wildtyp-Tieren sowie $67,3 \pm 3,6\%$ bei den Knockout-Tieren. Im Falle von Nachblutungen fiel der rCBF innerhalb von fünf bis 15 Minuten nach SAB-Induktion wieder etwas ab. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied in der regionalen zerebralen Durchblutung vor, während und nach SAB zwischen Knockout- und Kontroll-Tieren beobachtet werden.

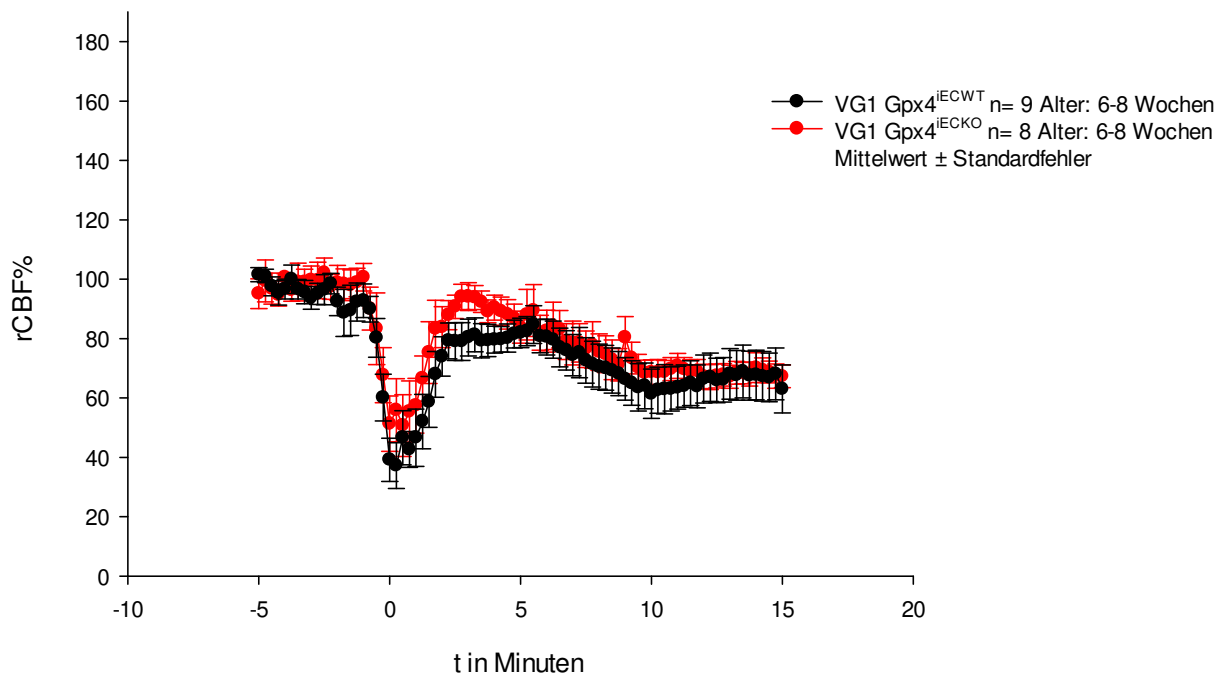


Abbildung 15 d.) rCBF-Werte der Versuchsgruppe 1. Ein deutlicher Abfall zum Zeitpunkt null bei SAB-Induktion könnte in beiden Tiergruppen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} beobachtet werden.

Endtidaler Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)

Der pCO₂-Wert lag bei den Wildtyp-Tieren bei Ausgangswerten von **26,9 ± 1,2 mmHg** und bei den Knockout-Tieren bei **25,6 ± 1,0 mmHg**. Nach der SAB konnte ein leichter Anstieg auf **30,4 ± 2,6 mmHg** bei den Wildtyp-Mäusen und ein etwas geringerer Anstieg auf **26,5 ± 1,2 mmHg** bei den Knockout-Mäusen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf fiel der pCO₂ wieder auf das fast ursprüngliche Niveau von **25,1 ± 0,7 mmHg** bei den Wildtyp-Tieren und **25,8 ± 0,9 mmHg** bei den Knockout-Tieren ab. Trotz des geringgradigen Anstiegs der pCO₂-Werte lässt sich für beide Gruppen sagen, dass während der SAB-Operation eine Normokapnie vorlag. Die pCO₂-Werte lagen während der gesamten OP-Dauer im Normobereich.

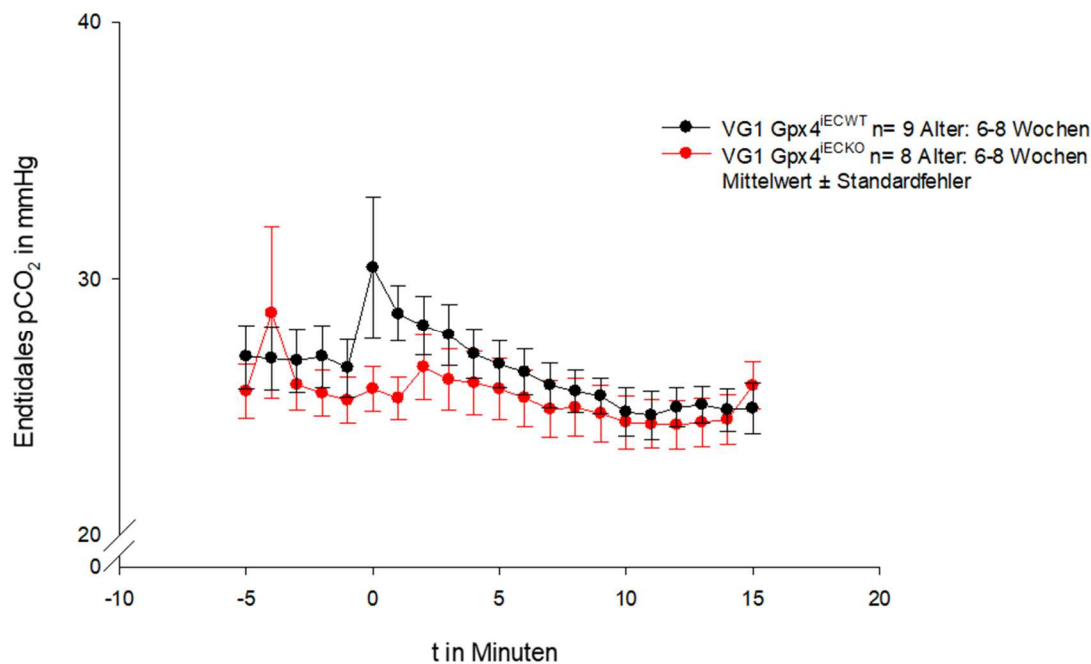


Abbildung 15 e.) Endtidale pCO₂-Werte der Versuchsgruppe 1.

Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde während des gesamten OP-Zeitraumes überwacht und konnte konstant auf einem stabilen Wert von **37,8 ± 0,1°C** bei den Wildtyp-Tieren sowie von **37,6 ± 0,1°C** bei den Knockout-Tieren gehalten werden, ohne auffallende Schwankungen nach SAB-Induktion bei beiden Gruppen. Die Gewährung einer stabilen Körpertemperatur bewahrte die Mäuse vor Auskühlung und einer damit verbundenen, möglichen Verschlechterung des Allgemeinzustands oder einer ungewollten hypothermen Therapie.

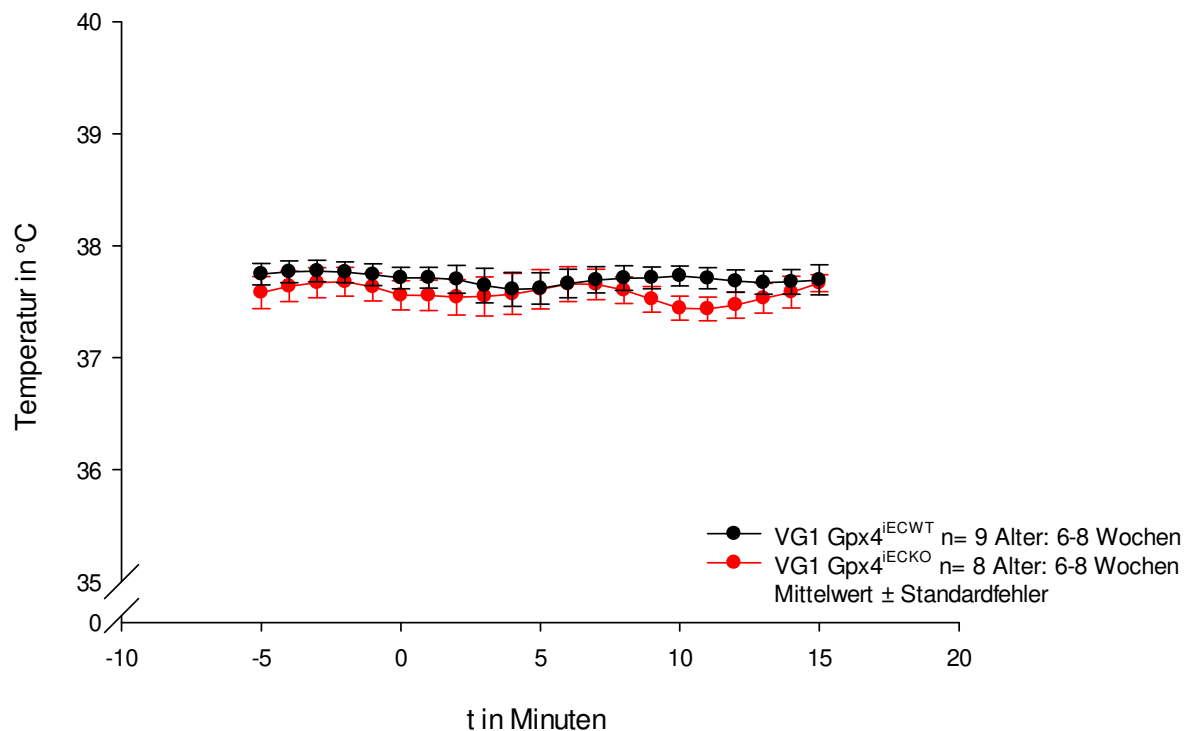


Abbildung 15 f.) Körpertemperatur der Versuchsgruppe 1. Auch die Werte für die Körpertemperatur lagen bei beiden Tiergruppen während der OP-Dauer im Normbereich.

3.1.2 Outcome nach SAB

Neurologische Funktionen

Um den neurologischen Status der Tiere nach SAB objektiv beurteilen zu können, wurden postoperativ über sieben Tage täglich neurologische Tests durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wurden die Tiere zwei Tage vor OP an diese Tests gewöhnt und trainiert. Bei der ersten durchgeführten Testung erzielten sowohl die Wildtyp- als auch die Knockout-Tiere Scores knapp über dem Nullpunkt, wobei ein Score von null Punkten das bestmögliche Ergebnis und ein Score von 31 Punkten das schlechtmögliche Testergebnis darstellten. Der leicht erhöhte Score der gesunden Tiere am zweiten präoperativen Tag lag an den für die Tiere unbekannten Tests. Bereits bei der zweiten Testung am Folgetag zeigten sich alle Tiere mit den Aufgaben vertraut und erzielten den bestmöglichen Score von null Punkten. Am Tag der SAB-Induktion wurde, wie bereits beschrieben, keine Testung durchgeführt. Am ersten postoperativen Tag zeigte sich bei den Tieren beider Gruppen erwartungsgemäß eine deutliche Verschlechterung des neurologischen Status, die sich in hohen Score-Werten nachweisen ließ. Die Wildtyp-Tiere erreichten somit einen mittleren Score von **4,1 ± 1,2 Punkten** und der Score der Knockout-Tiere lag nochmals deutlich höher bei **6,5 ± 1,0 Punkten**, wobei der Unterschied in den beiden Gruppen keine statistische Signifikanz erreicht. Bereits

am zweiten post-OP Tag zeigte sich eine wesentliche Verbesserung der funktionellen Defizite in beiden Gruppen. So erreichten die Wildtyp-Mäuse einen neurologischen Score von **$2,2 \pm 1,1$ Punkten** und die Knockout-Mäuse einen ähnlichen Score von **$2,6 \pm 0,9$ Punkten**. Im weiteren postoperativen Verlauf bis zum Versuchsende am siebten postoperativen Tag zeigte sich keine weitere Verbesserung des neurologischen Status. Die ermittelten Neuroscores an den Tagen drei bis sieben lagen bei beiden Gruppen annähernd im gleichen Bereich der erreichten Scores am zweiten Tag. Auch wenn die Knockout-Tiere anfänglich post-OP ein stärkeres neurologisches Defizit zeigten, war der neurologische Status im weiteren Verlauf vergleichbar mit dem Status der Wildtyp-Tiere.

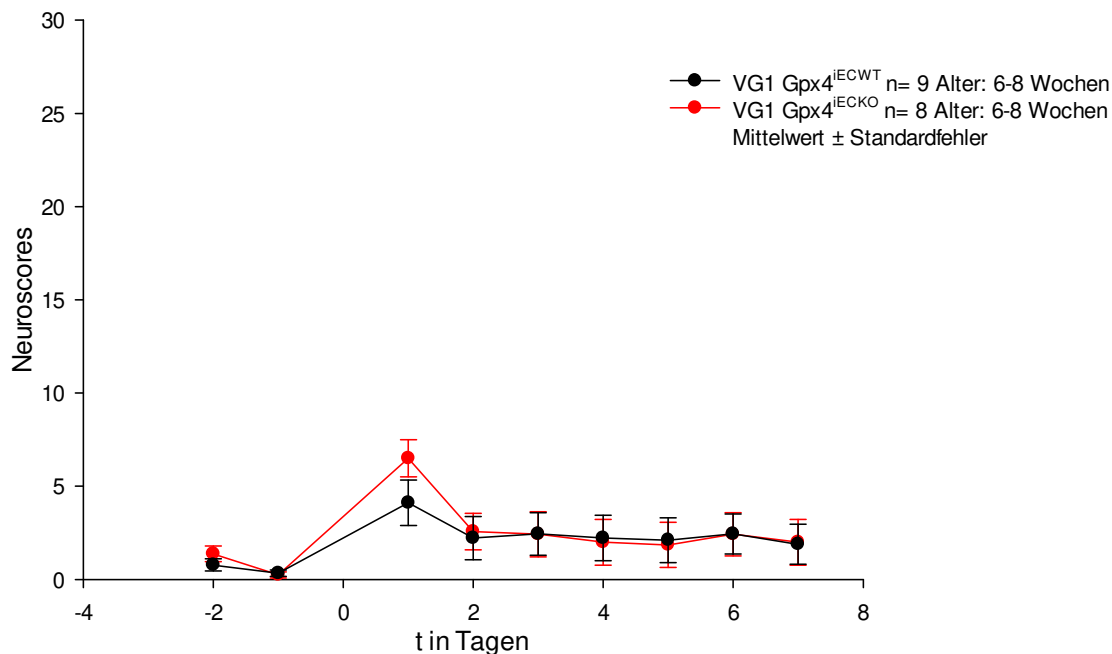


Abbildung 16 a.) Neuroscores der Versuchsgruppe 1. Am ersten post-OP Tag konnte bei den Knockout-Tieren ein höheres neurologisches Defizit bei den Gpx4^{iECKO} im Vergleich zu den Gpx4^{iECWT} beobachtet werden, während im weiteren Verlauf beide Gruppen ein ähnliches neurologisches Defizit zeigten.

Körpergewicht

Das Ausgangsgewicht der Mäuse beider Gruppen war ähnlich hoch (Wildtyp-Tiere: **$20,8 \pm 0,8$ g**, Knockout-Tiere: **$20,3 \pm 0,9$ g**). Am ersten postoperativen Tag zeigte sich bei beiden Gruppen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zum präoperativen Ausgangsgewicht (Gpx4^{iECWT} **$18,4 \pm 0,9$ g** und Gpx4^{iECKO} **$17,9 \pm 0,7$ g**). An darauffolgenden beiden Tagen wurde das niedrigste Körpergewicht dokumentiert, dass bei den Wildtyp-Tieren bei **$17,8 \pm 0,9$ g** (zweiter post-OP Tag) bzw. bei **$17,8 \pm 0,8$ g** (dritter post-OP Tag) und bei den Knockout-Tieren

bei $16,5 \pm 0,9$ g (zweiter post-OP Tag) bzw. bei $16,3 \pm 0,7$ g (dritter post-OP Tag) lag. Im weiteren Verlauf stieg das Körpergewicht kontinuierlich bis zum Versuchsende an, die Tiere erreichten jedoch nicht mehr ihr Ausgangsgewicht. Am siebten Tag bei Versuchsende lag das Gewicht der Wildtyp-Mäuse bei $19,2 \pm 0,9$ g und das Gewicht der Knockout-Mäuse bei $18,3 \pm 0,9$ g. Dieser Gewichtsunterschied zwischen den Wildtyp- und Knockout-Tieren erwies sich in den statistischen Tests als signifikant ($p < 0,05$). Somit zeigten die Gpx4 Knockout-Tiere beim Parameter Körpergewicht ein signifikant schlechteres Outcome im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen.

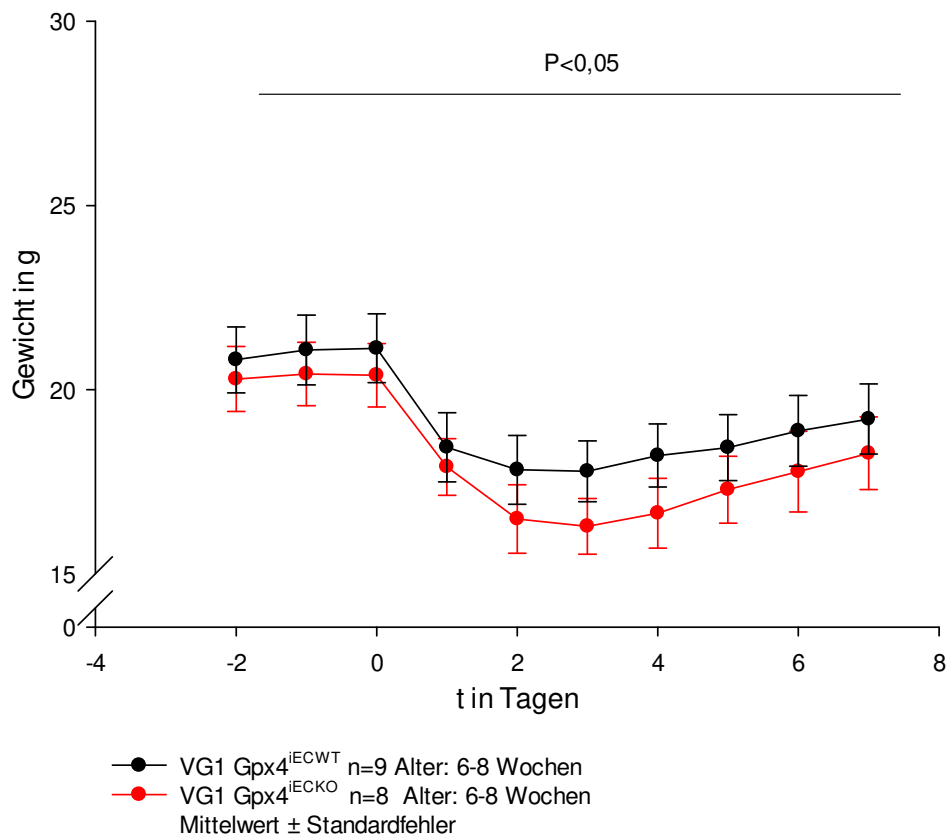


Abbildung 16 b.) Gewichtsverlauf der Versuchsgruppe 1. Alle Tiere zeigten an den drei Tagen nach SAB-Induktion einen deutlichen Gewichtsverlust. Im weiteren postoperativen Verlauf stieg das Körpergewicht wieder kontinuierlich an. Der beobachtete Gewichtsunterschied zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} zeigte sich als statistisch signifikant.

Überleben

In der Versuchsgruppe 1 musste während des gesamten postoperativen Verlaufs über sieben Tage nach SAB von insgesamt 17 Mäusen nur eine Maus vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Hierbei handelte es sich um eine Maus aus der Knockout-Gruppe, wohingegen alle Wildtyp-Mäuse das Versuchsende am siebten Tag erreichten. Somit ergibt

sich eine Überlebensrate von **87,5%** bei den Knockout-Tieren und von **100%** bei den Wildtyp-Tieren.

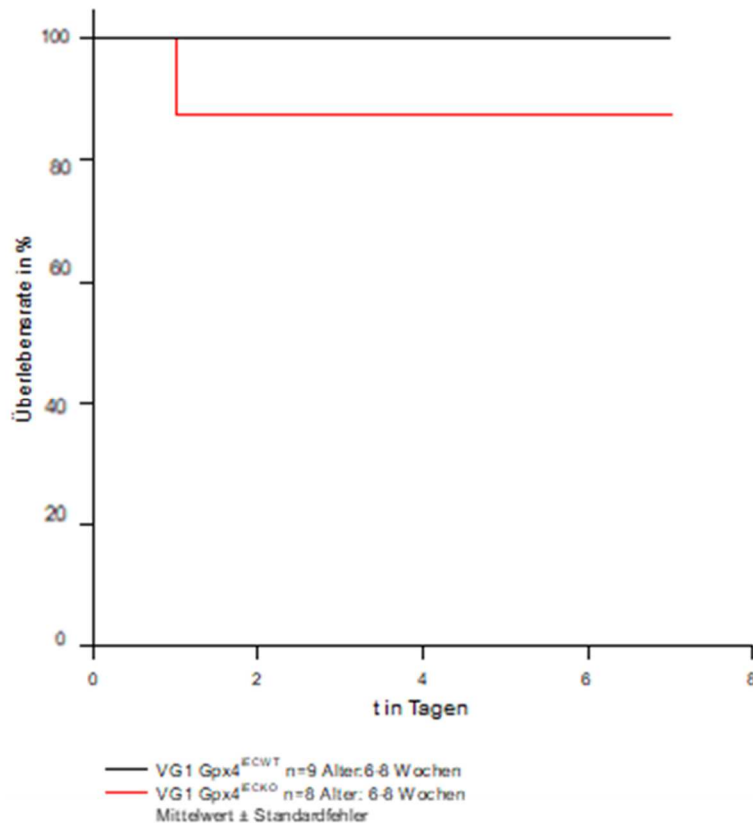


Abbildung 16 c.) Überleben der Versuchsgruppe 1. In der Gruppe der Knockout-Tiere erreichte ein Tier das Versuchsende nicht, wohingegen alle Wildtyp-Tiere das Versuchsende nach sieben Tagen post-OP erreichten.

3.1.3 Histologie

Neuronaler Zellschaden

Nach histologischer Aufbereitung wurden die untergegangenen Neurone in der Hippocampus-Region an Hand von koronaren Paraffinschnitten beider Gehirnhälften bei Wildtyp- und Knockout-Tieren bestimmt. Um eine möglichst objektive Bestimmung der Zellzahl zu erreichen, wurden zur Auswertung definierte Zählrahmen über die unterschiedlichen Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 gesetzt. Ipsilateral, d.h. in der linken Gehirnhälfte, dort wo die SAB induziert wurde, ergab sich bei beiden Gruppen konsequenterweise eine höhere Anzahl an untergegangenen Neuronen als in der kontralateralen Gehirnhälfte. In der ipsilateralen Hemisphäre zeigte sich in beiden Gruppen keine statistisch signifikanten regionalen Unterschiede für die mittlere Anzahl an untergegangenen Neuronen. So wurden für die Wildtyp-Tiere in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 **17,9 ± 6,7**, **15,0 ± 4,7**, **17,5 ± 5,4** und **17,9 ± 4,5** untergegangene Neurone ermittelt. Im Gegensatz dazu ergab die Auswertung für die Knockout-Tiere in den entsprechenden Regionen **16,6 ± 7,6**,

17,5 ± 7,3, 18,1 ± 6,4 und 17,0 ± 5,9 untergegangene Neurone. Es ergaben sich somit keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für die ipsilaterale SAB-Gehirnseite.

In der kontralateralen Hemisphäre wurden für die Wildtyp-Tiere eine mittlere Anzahl von **8,3 ± 0,8, 8,0 ± 0,4, 10,8 ± 1,2 und 13,7 ± 1,5** abgestorbenen Neuronen in den Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 berechnet. Die Zellzahlen untergegangener Neurone der Knockout-Tiere lagen im Vergleich bei **9,9 ± 0,9, 7,5 ± 0,8, 14,7 ± 1,3 und 13,9 ± 1,0** in den entsprechenden Regionen. Damit wurde auch bei Auswertung der Anzahl der untergegangenen Neuronen des Hippocampus in der kontralateralen Gehirnseite kein signifikanter Unterschied detektiert.

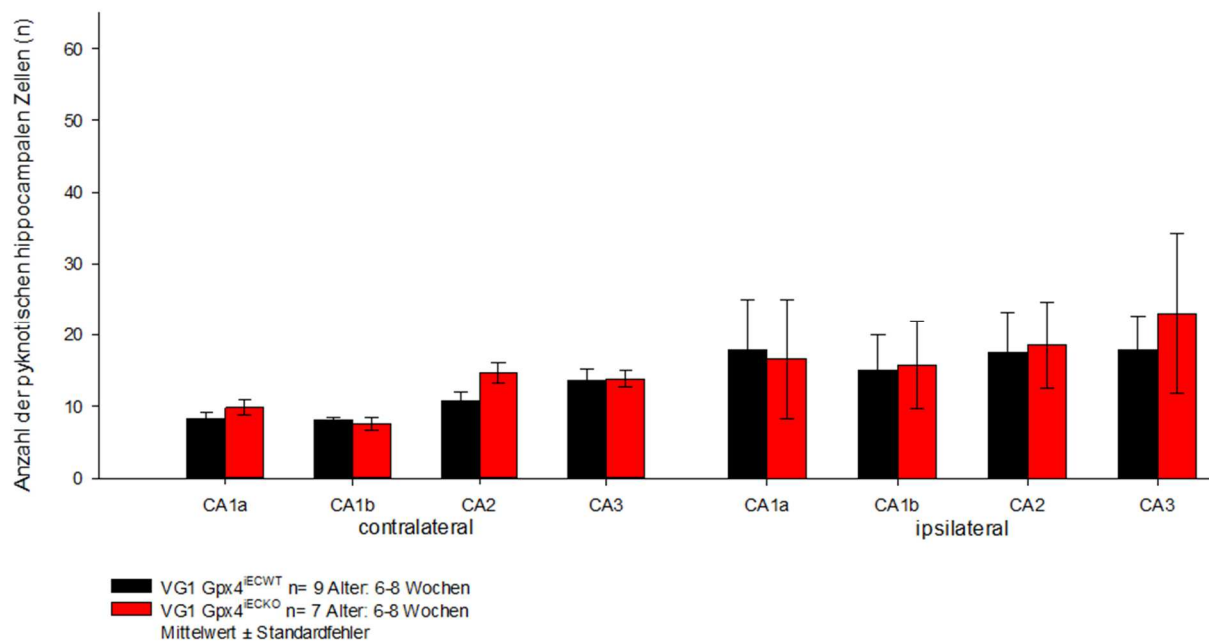


Abbildung 17. Neuronaler Zellschaden in der Versuchsgruppe 1. Zur Ermittlung des neuronalen Zellschadens nach SAB wurden die untergegangenen Neurone kontra- (links) und ipsilateral (rechts) in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3 bestimmt. Für beide Gehirnhälften konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gpx4^{ECWT} und Gpx4^{IECKO} beobachtet werden.

Auswertung des Hydrozephalus

Um das Ausmaß des Hydrozephalus bei den Tieren zu beurteilen, wurde an Hand der histologischen Schnitte das Verhältnis der beiden Ventrikel zur Gesamtgehirnfläche berechnet. Je ausgeprägter sich der Hydrozephalus nach SAB entwickelt, desto höher stellt sich der relative Ventrikelanteil dar. Bei den Wildtyp-Tieren ergaben die Berechnungen hier einen leicht höheren Wert mit **2,2 ± 0,3%** gegenüber den Knockout-Tieren mit **1,7 ± 0,3%**, der sich aber als nicht statistisch signifikant unterschiedlich erwies.

Im Vergleich dazu betrug der relative Ventrikelanteil bei scheinputierten Mäusen in vergleichbaren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ca. 1,2% (siehe Referenzlinie der Abbildung 18) (132).

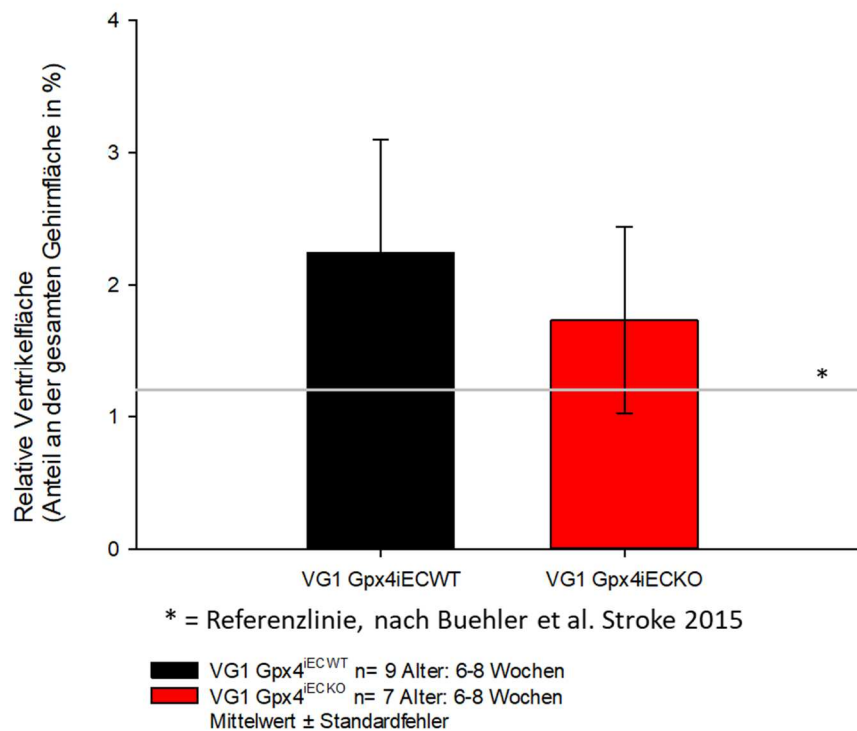


Abbildung 18.
Hydrozephalus der Versuchsguppe 1. Für das Ausmaß des Hydrozephalus, gemessen am Anteil der beiden Ventrikel an der gesamten Gehirnofläche, ergab sich für die beiden Gruppen Gpx4^{iECWT} und Gpx4^{iECKO} kein Unterschied.

Schädigung der weissen Substanz durch Bestimmung der Dicke des Corpus Callosum

Zur Bestimmung des Grads der Schädigung der weissen Substanz wurde die Dicke bzw. auf den histologischen Schnitten die Höhe des Corpus Callosum gemessen. Gemessen wurde jeweils an der breitesten Stelle des Corpus Callosum, sowohl auf der ipsilateralen als auch auf der kontralateralen Gehirnhälfte. Interessanterweise zeigten zwar die meisten Tiere, wie zu erwarten, eine niedrigere Dicke des Corpus Callosum und somit stärkere Substanzschädigung auf der vom Schlaganfall betroffenen ipsilateralen Seite, aber nicht alle. Insbesondere bei den Knockout-Tieren ist der geringe Unterschied zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite auffällig (428,1; 554,8; 561,6; 497,6; 476,5; 448,2; 461,0 versus 448,5; 542,5; 552,9; 491,7; 467,1; 483,1; 482,8). Insgesamt gilt aber festzuhalten, dass sich zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Dicke des Corpus Callosum ergab.

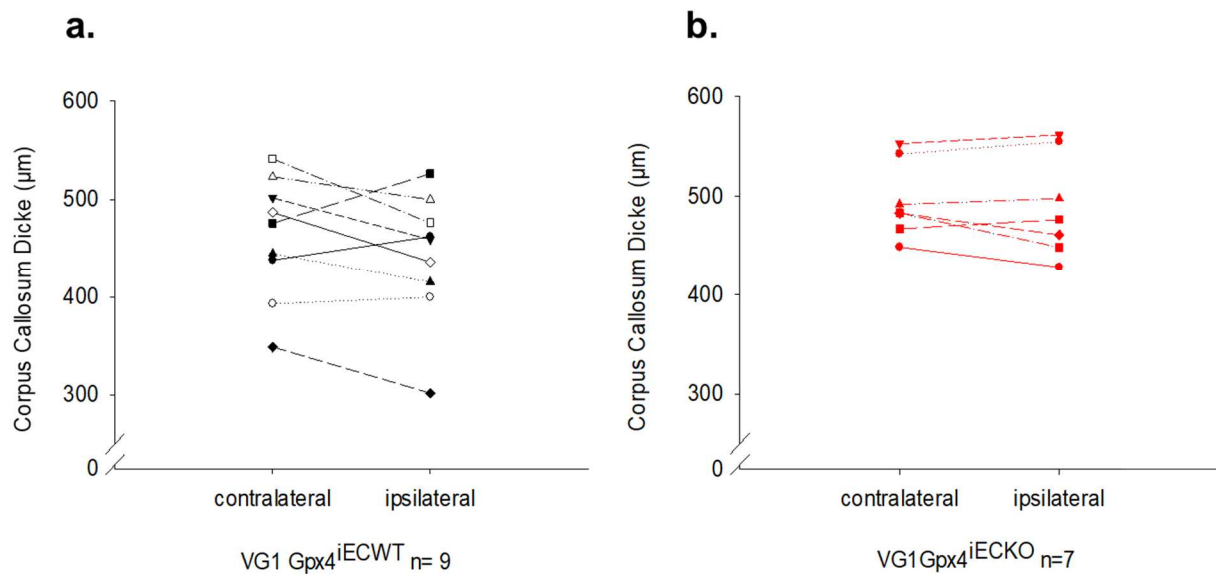


Abbildung 19 a-b. Bestimmung der Dicke des Corpus Callosum der Versuchsgruppe 1.

a.) Dicke des Corpus Callosum der kontra- und ipsilateralen Seite bei den Wildtyp-Tieren.

b.) Dicke des Corpus Callosum der kontra- und ipsilateralen Seite bei den Knockout-Tieren.

Je kleiner das Verhältnis der Corpus Callosum Dicke ipsilateral zu kontralateral, desto ausgeprägter die Schrumpfung, respektive die Schädigung der weißen Substanz ipsilateral zu kontralateral. Wie aus den Einzelwerten für die Dicke des Corpus Callosum bereits ersichtlich, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die mittlere Dicke des Corpus Callosum zwischen ipsi- und kontralateraler Seite bei beiden Gruppen. So liegt das Verhältnis ipsi- zu kontralateraler Seite sowohl bei den Wildtyp-Tieren mit $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ als auch bei den Knockout-Tieren mit $0,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ knapp bei 1.

Der Vergleichswert bei scheinoperierten Tieren lag durchschnittlich ebenfalls bei 1,00 (132).

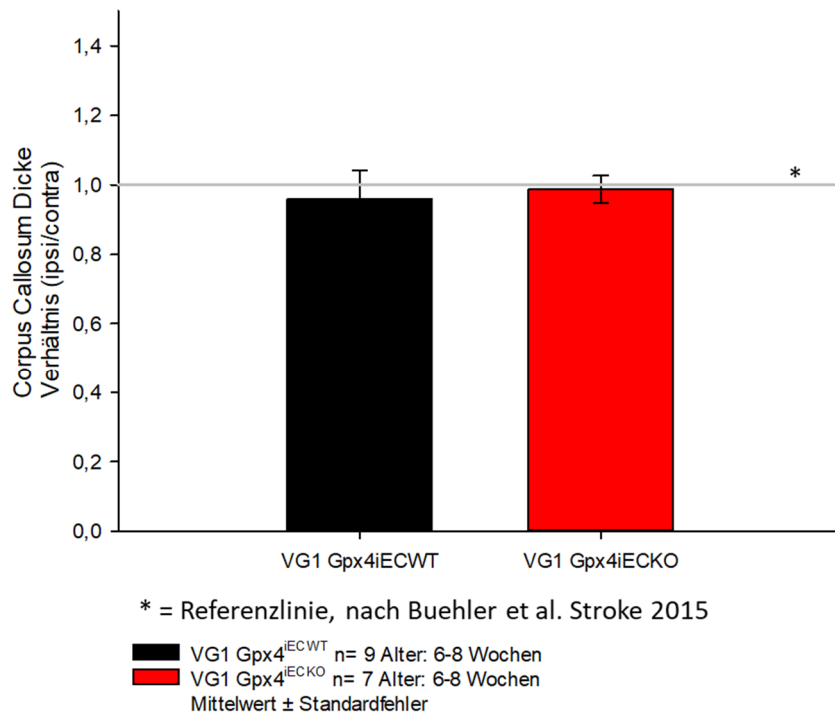


Abbildung 20. Corpus Callosum Dicke Verhältnis der Versuchsgruppe 1. Zur Beurteilung der Zerstörung der weißen Substanz auf der Schlaganfallseite gegenüber der Nicht-Schlaganfallseite wurde die jeweilige Dicke des Corpus Callosum ins Verhältnis gesetzt. Bei den beiden Gruppen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} lag dieser Wert nahezu bei eins.

3.2 Versuchsgruppe 2: SAB bei Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO}-Tieren im Alter von sechs bis acht Monaten

Nachdem in Versuchsgruppe 1 bei den endothelialen Gpx4 Knockout-Tieren kein signifikanter Unterschied nach SAB im Vergleich mit Wildtyp-Tieren beobachtet werden konnte, sollten in einem weiteren Versuchsansatz, Versuchsgruppe 2, ältere Knockout-Tiere mit Wildtyp-Tieren nach SAB verglichen werden. Die altersbedingte, chronische Akkumulation von Oxidationsprodukten sollte hierbei als zusätzlicher oxidativer Stressfaktor zum endothelialen Gpx4-Verlust ausgenutzt werden, um mögliche Unterschiede beim SAB-Outcome zu entschlüsseln. Für Versuchsgruppe 2 wurden Gpx4 Knockout- und Wildtyp-Geschwistertiere im Alter von sechs bis acht Monaten verwendet. Die Mäuse wurden drei bis vier Wochen vor der experimentellen SAB mit Tamoxifen zur Knockout-Induktion behandelt. Um zu überprüfen, ob das Alter ein Kriterium ist, das das Outcome nach einer SAB bei Gpx4 Knockout-Tieren versus Wildtyp-Tieren beeinflusst, wurden Versuchsgruppe 1 (sechs bis acht Wochen alte Tiere) und Versuchsgruppe 2 (sechs bis acht Monate alte Tiere) miteinander verglichen. Der Vergleich wurde für die Outcome-bestimmenden Parameter wie neurologisches Defizit, Körpergewicht, Überleben und hippocampale Neuronenuntergang durchgeführt. Es wurden insgesamt 21 Versuchstiere, zehn Gpx4^{IECWT} und elf Gpx4^{IECKO} operiert.

3.2.1 Intraoperative Parameter

Abbildung 21 a-h. Zusammenstellung der intraoperativ erhobenen Daten. Abgebildet sind die während der SAB-Induktion erhobenen physiologischen Parameter der Versuchsgruppe 2. Die Daten wurden fünf Minuten vor bis 15 Minuten nach SAB-Induktion aufgezeichnet. Gpx4^{IECWT} sind in **Lila** dargestellt und Gpx4^{IECKO} in **Grün**.

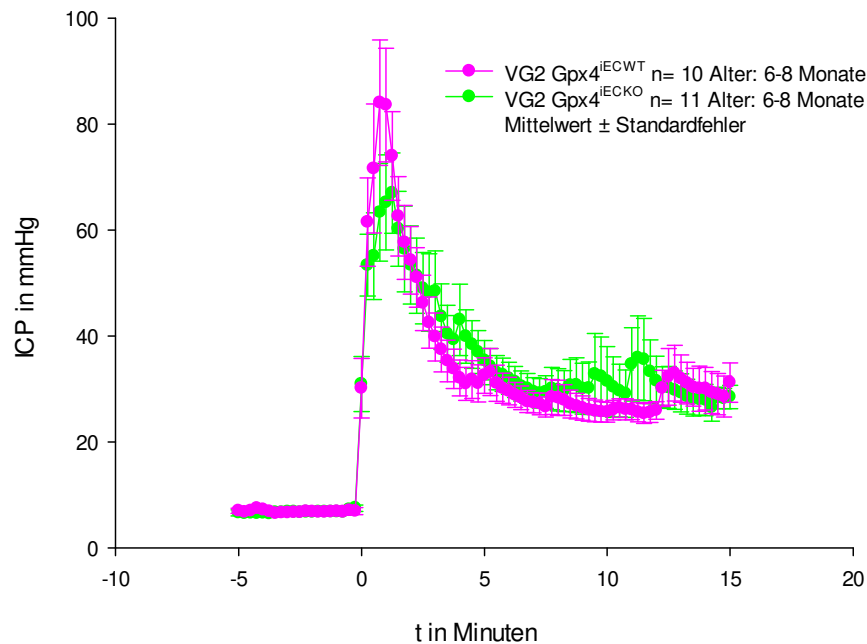


Abbildung 21 a.) ICP-Werte der Versuchsgruppe 2 mit einem deutlichen Peak bei SAB-Induktion zum Zeitpunkt null.

Intrakranieller Druck (ICP)

Bereits am intrakraniellen Druck ließen sich bei dieser Versuchsgruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe 1 etwas höhere ICP-Maximalwerte bei Auslösung der SAB erkennen. So hatten die älteren Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 2 einen mittleren ICP-Maximalwert von **84,1 ± 11,4 mmHg** und die Knockout-Tiere einen mittleren Wert von **67,0 ± 7,2 mmHg**. Im Vergleich dazu lagen die Werte der jüngeren Tiere der Versuchsgruppe 1 bei **68,5 ± 6,0 mmHg** und bei **58,2 ± 7,1 mmHg**. Die Ausgangs- und die Endwerte waren entsprechend ebenfalls höher als bei Versuchsgruppe 1 und lagen bei den Wildtyp-Tieren bei **7,0 ± 0,4** und **31,2 ± 3,0 mmHg** und bei den Knockout-Tieren bei **6,6 ± 0,6** und **28,5 ± 2,0 mmHg**.

Nachblutungen

In der Versuchsgruppe 2 hatten von den zehn Wildtyp-Tieren vier Tiere eine oder zwei Nachblutungen, insgesamt **0,36 ± 0,19** Nachblutung pro Tier. Von den elf Knockout-Tieren hatten drei Mäuse Nachblutungen, insgesamt **0,5 ± 0,21** Nachblutungen pro Tier. Dies

entspricht einer **40%**igen Nachblutungsrate bei den Wildtyptieren und einer **27%**igen bei den Knockout-Tieren. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Mäusen der Versuchsgruppe 2. Im Vergleich dazu gab es bei den Wildtyptieren der Versuchsgruppe 1 **0,22 ± 0,14** Nachblutung pro Tier und eine **22%**ige Nachblutungsrate und beiden Knockout-Tieren **0,25 ± 0,15** Nachblutung pro Tier eine **25%**ige Nachblutungsrate, mit keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

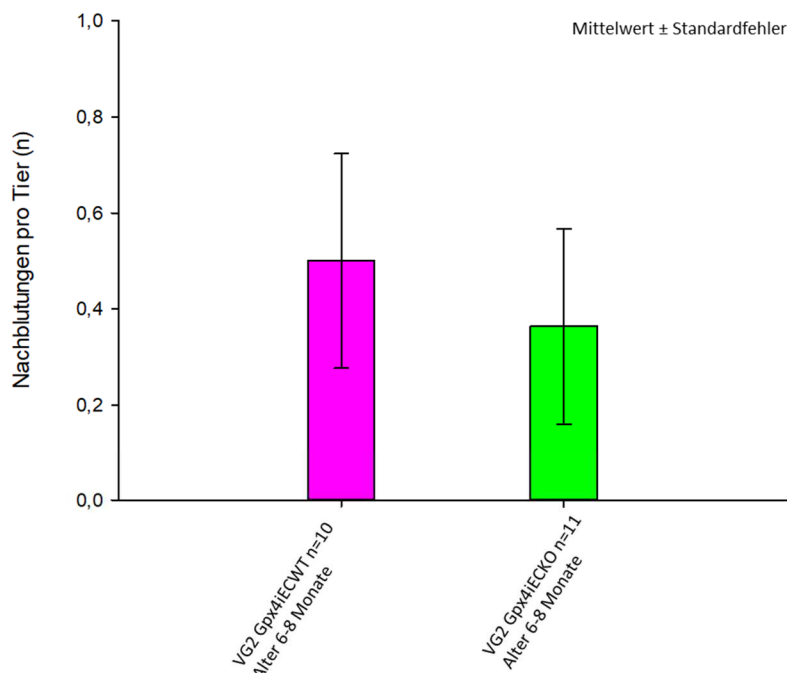


Abbildung 21 b.) Darstellung der Nachblutungen pro Tier der Versuchsgruppe 2. Der beobachtete Unterschied in den Nachblutungen zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} zeigte sich als nicht statistisch signifikant.

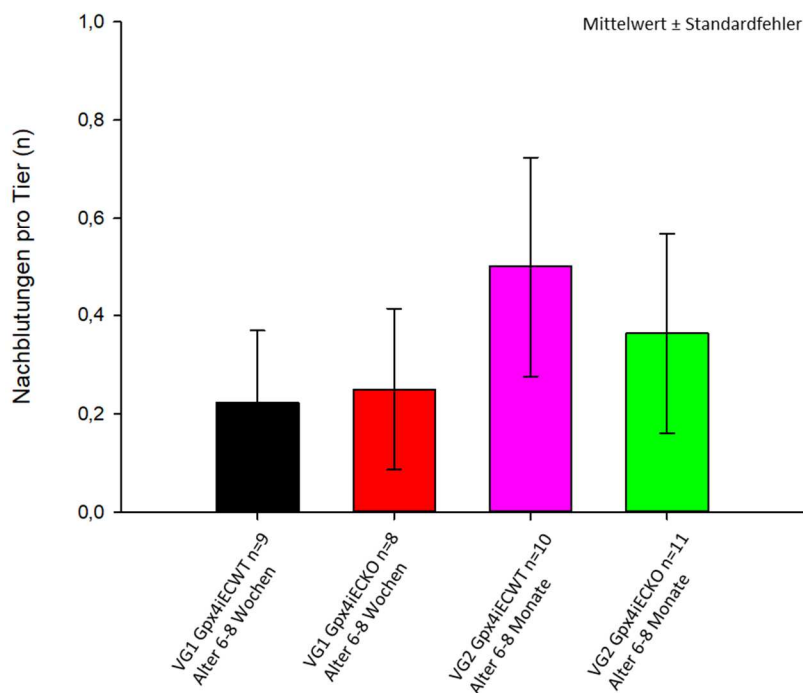


Abbildung 21 c.) Darstellung der Nachblutungen pro Tier der Versuchsgruppe 1 und 2. Der beobachtete Unterschied in den Nachblutungen zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} der beiden Versuchsgruppen zeigte sich als nicht statistisch signifikant.

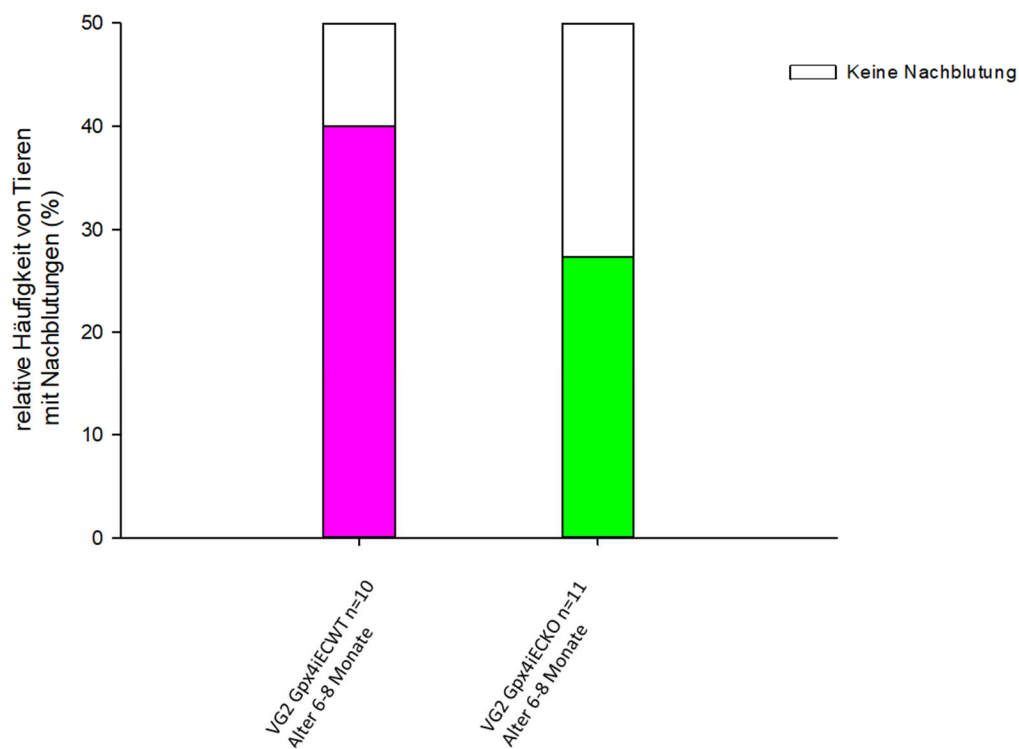


Abbildung 21 d.) Darstellung der relativen Häufigkeit von Tieren mit Nachblutungen der Versuchsgruppe 2.

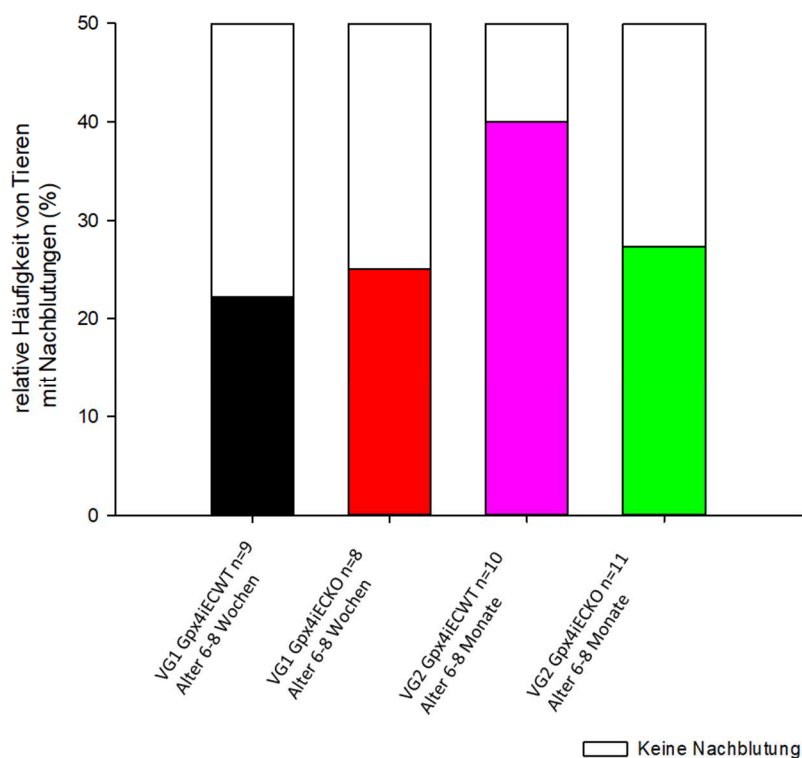


Abbildung 21 e.) Darstellung der relativen Häufigkeit von Tieren mit Nachblutungen der Versuchsgruppe 1 und 2.

Regionale zerebrale Durchblutung (rCBF)

Ähnliches wurde bei der regionalen zerebralen Durchblutung beobachtet; die rCBF-Werte der älteren Tiere der Versuchsgruppe 2 fielen insgesamt stärker ab als die der jüngeren Tiere der Versuchsgruppe 1. Bei den älteren Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 2 lag der rCBF an seinem tiefsten Punkt bei $33,6 \pm 7,0\%$ des Ausgangswertes im Vergleich zu $37,2 \pm 7,3\%$ bei der Versuchsgruppe 1. Bei den älteren Knockout-Tieren fiel der rCBF-Wert ebenfalls tiefer bis auf $23,7 \pm 8,1\%$, bei den jüngeren Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 1 lag dieser bei $50,7 \pm 9,7\%$ im Vergleich.

Zudem ist zu erwähnen, dass bei den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 2 der mittlere rCBF-Wert mit einem finalen Anstieg auf $110,4 \pm 14,8\%$ über dem Ausgangswert lag, während die Knockout-Tiere mit einem abschließenden rCBF-Wert von $95,0 \pm 12,4\%$ beinahe den 100%igen Ausgangswert wieder erreichten. Im Vergleich dazu verhielten sich die rCBF-Werte der Versuchsgruppe 1 bis zum Schluss hin einheitlich und flachten auf ca. 68% gegenüber dem Ausgangswert ab.

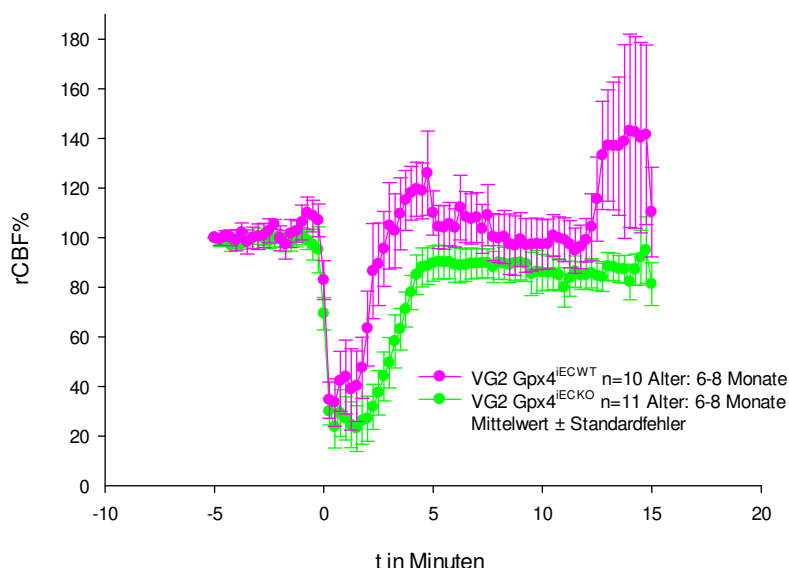


Abbildung 21 f.) rCBF-Werte der Versuchsgruppe 2. Ein deutlicher Abfall zum Zeitpunkt null bei SAB-Induktion konnte in beiden Tiergruppen, Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO}, beobachtet werden.

Endtidaler Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)

Der mittlere pCO₂-Wert zeigte bei den Wildtyp-Mäusen eine minimale Abflachung von $28,5 \pm 0,8$ mmHg zu Anfang auf $26,3 \pm 0,9$ mmHg zu Ende der OP. Bei den Knockout-Mäusen blieb er dagegen durchgehend konstant bei ca. $26,5 \pm 0,8$ mmHg. Bei Versuchsgruppe 1 konnte hingegen eine einheitliche Abflachung des mittleren rCBF-Werts in beiden Gruppen, Gpx4 Knockout und Wildtyp, registriert werden.

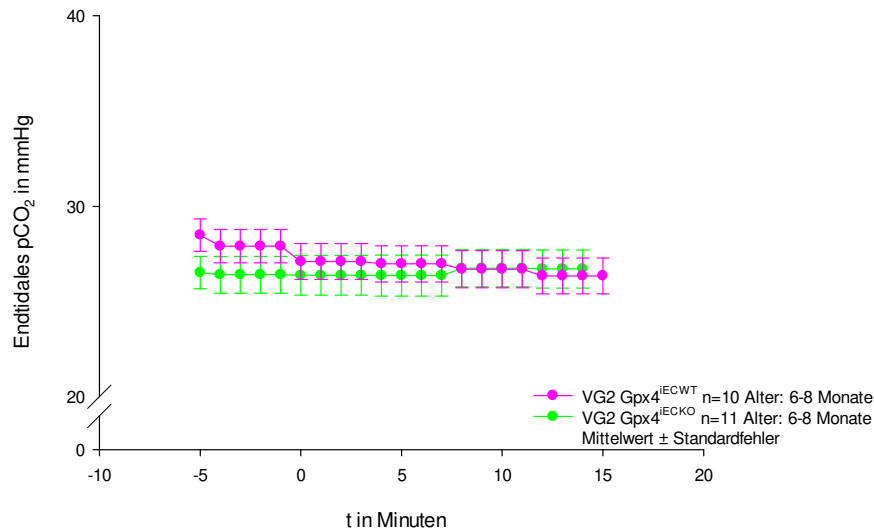


Abbildung 21 g.)
Endtidale pCO₂-Werte
der Versuchsgruppe 2.
 Die pCO₂-Werte lagen
 während der gesamten
 OP-Dauer im Normbereich.

Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Versuchsgruppe 2 verhielt sich während der OP-Dauer stets konstant. Sowohl für die Wildtyp-Tiere als auch für die Knockout-Tiere betrug die Temperatur über den gesamten Überwachungszeitraum rund 37,8°C ohne signifikante Veränderungen nach Induktion der SAB.

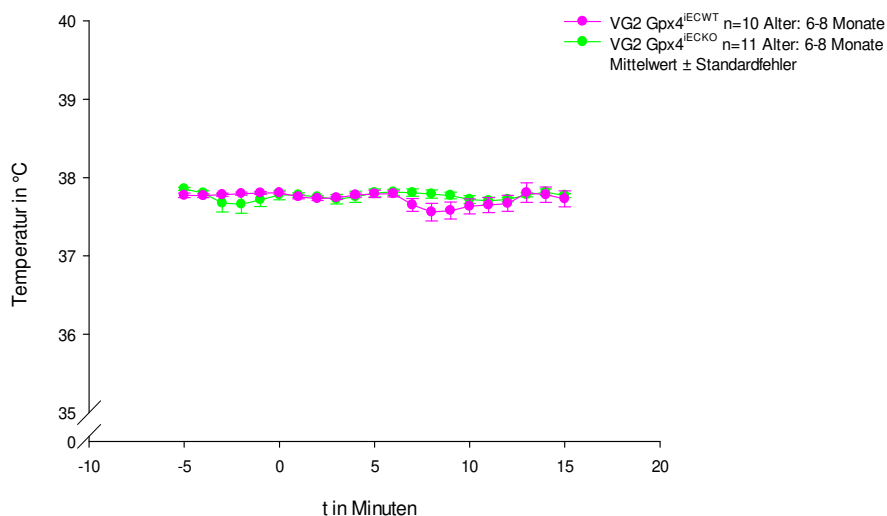


Abbildung 21 h.)
Körpertemperatur der
Versuchsgruppe 2.
 Auch die Werte für die
 Körpertemperatur lagen
 bei beiden Tiergruppen
 während der OP-Dauer
 im Normbereich.

3.2.2 Outcome nach SAB

Neurologische Funktionen

Analog zu Versuchsgruppe 1 zeigten die Tiere der Versuchsgruppe 2 einen niedrigen Ausgangs-Score, die Tiere zeigten einen guten neurologischen Status. Die Wildtyp-Tiere hatten einen Score von **1,4 ± 0,3 Punkten** einen Tag vor der SAB-Induktion und die Knockout-

Tiere einen Score von **1,9 ± 0,5 Punkten**. Dennoch lagen diese Werte bereits vor der SAB bereits etwas höher als die entsprechenden Werte der Versuchsgruppe 1 mit Scores von **0,3 ± 0,2 Punkten** für die Gpx4^{IECWT}- und **0,3 ± 0,2 Punkten** für die Gpx4^{IECKO}-Tiere.

Einen Tag nach SAB zeigten die älteren Tiere der Versuchsgruppe 2 deutlich höhere neurologische Defizite als die jüngeren Tiere der Versuchsgruppe 1. In der Versuchsgruppe 2 erzielten die Wildtyp-Tiere einen Score von **13,3 ± 2,3 Punkten** und die Knockout-Tiere einen Score von **13,8 ± 1,6 Punkten**. Im Vergleich dazu lagen die Maximalwerte für den neurologischen Score der jüngeren Versuchsgruppe 1 bei **4,1 ± 1,2 Punkten** für die Wildtyp-Tiere und bei **6,5 ± 0,9 Punkten** für die Knockout-Tiere. Der Unterschied in den neurologischen Scores der Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 1 und 2, sowie der Unterschied der Knockout-Tiere der Gruppen 1 und 2 zeigte sich als statistisch signifikant. Obgleich sich der neurologische Status der Versuchsgruppe 2 im weiteren postoperativen Verlauf nach SAB, ähnlich der Versuchsgruppe 1, täglich verbesserte, erreichten am Versuchsende nur die Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 2 ihren neurologischen Ausgangsstatus mit einem Score von **1,4 ± 0,3 Punkten**. Im Gegensatz dazu zeigten die Knockout-Tiere der Versuchsgruppe 2 bis zum finalen, siebten postoperativen Versuchstag mit **6,5 ± 1,8 Punkten** einen mittleren neurologischen Score, der deutlich über dem Ausgangswert von **1,9 ± 0,5 Punkten** lag.

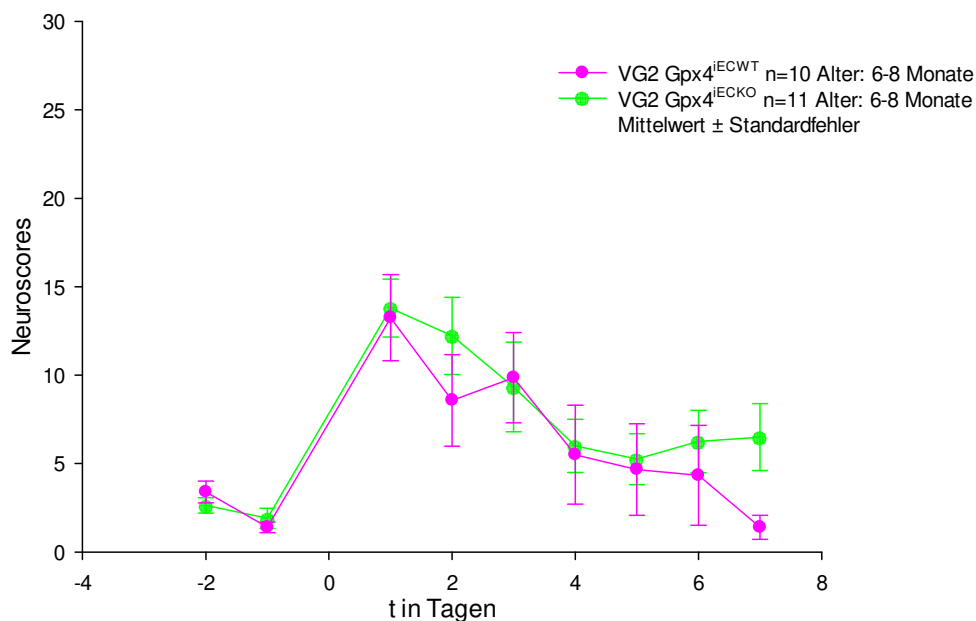


Abbildung 22 a.) Neuroscores der Versuchsgruppe 2.

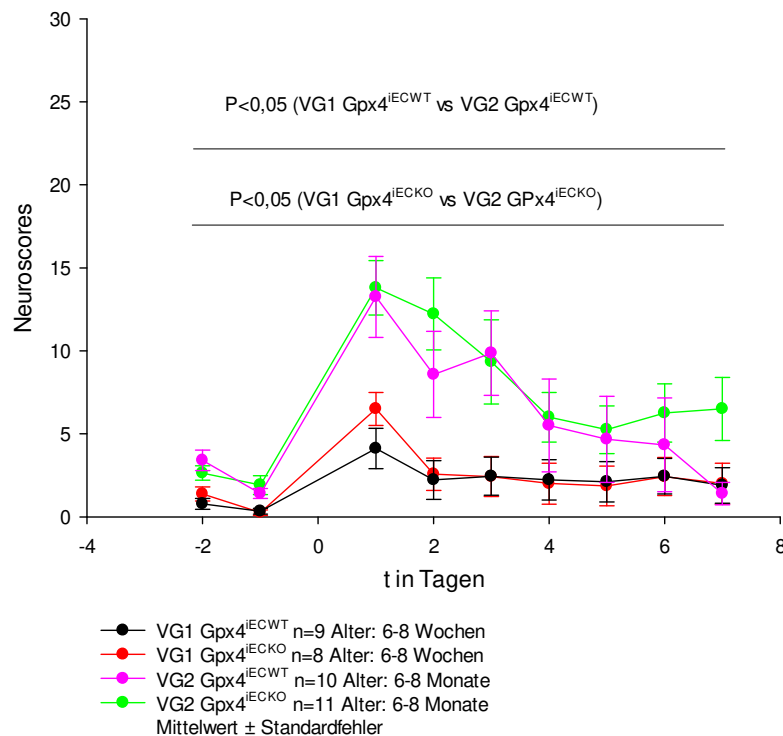


Abbildung 23 a.) Neuroscores der Versuchsgruppe 1 und 2 ** mit einem statistisch signifikanten Unterschied sowohl zwischen den Knockout-Tieren als auch zwischen den Wildtyp-Tieren der beiden Gruppen 1 und 2.

Körpergewicht

Der postoperative Verlauf des Körpergewichts der Mäuse aus Versuchsgruppe 2 verhielt sich ähnlich wie bei Versuchsgruppe 1. Erwartungsgemäß hatten die Mäuse der Versuchsgruppe 2 ein signifikant höheres Ausgangsgewicht mit **23,4 ± 0,2 g** für die Wildtyp-Tiere und **24,2 ± 0,5 g** für die Knockout-Tiere im Vergleich zu den jüngeren Tieren der Versuchsgruppe 1 mit **20,3 ± 0,8 g** für die Wildtyp-Tiere und **20,3 ± 0,8 g** für die Knockout-Tiere. Auch bei den Tieren der Versuchsgruppe 2 kam es unmittelbar nach SAB zu einem signifikanten Gewichtsverlust. Der Gewichtsverlust hielt bis zum vierten postoperativen Tag an und sank auf Werte von **19,8 ± 1,1 g** bei den Wildtyp-Tieren und **19,2 ± 0,7 g** bei den Knockout-Tieren. Das durchschnittliche Gewicht bei Versuchsende lag sowohl für die

Wildtyp- als auch für die Knockout-Tiere bei rund 21 g.

Wie bei Versuchsgruppe 1 lag somit auch bei den Tieren der Versuchsgruppe 2 das Endgewicht deutlich unter dem Ausgangsgewicht vor SAB-Induktion. Statistisch ergab sich ein signifikanter Unterschied (*) zwischen dem Gewichtsverlauf der Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppen 1 und 2, sowie der Knockout-Tiere der Versuchsgruppen 1 und 2.

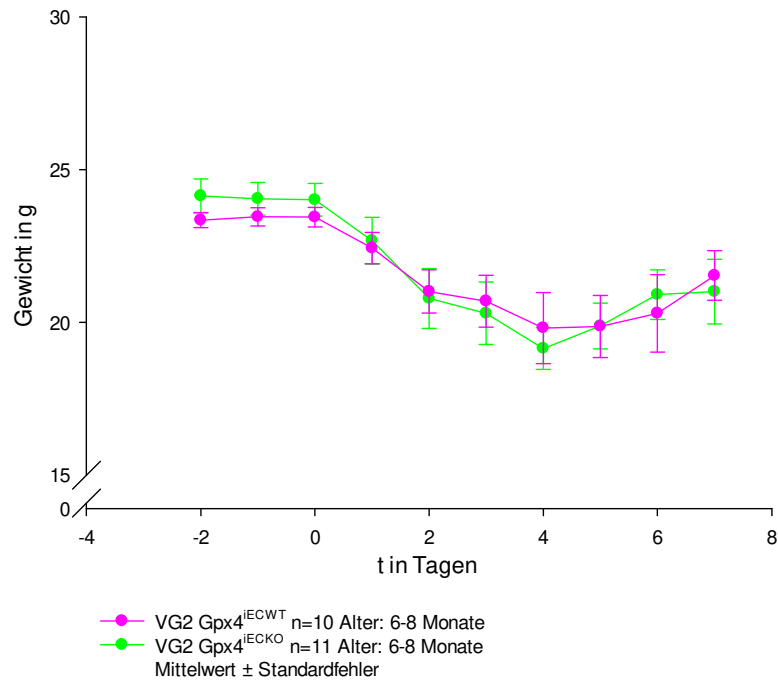


Abbildung 22 b.) Gewichtsverlauf der Versuchsgruppe 2.

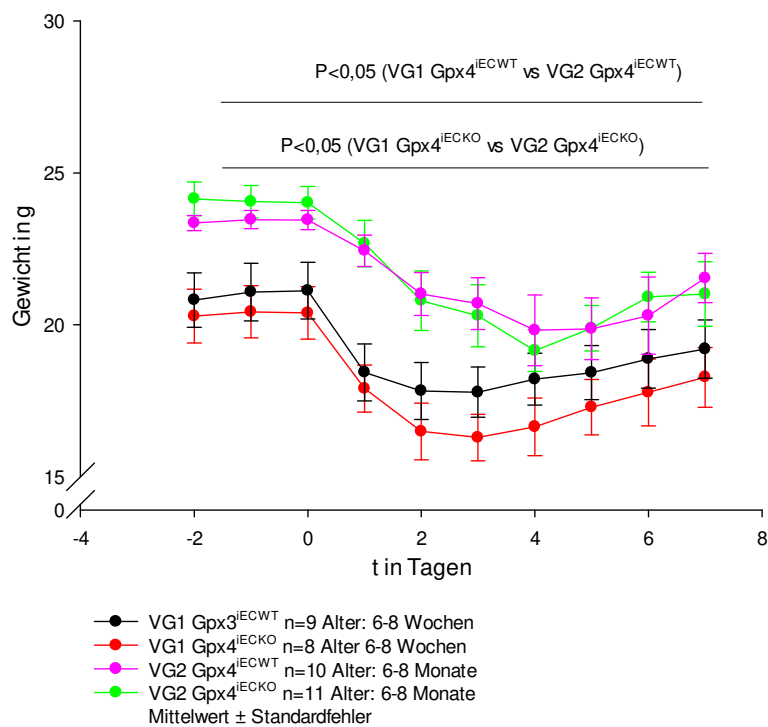


Abbildung 23 b.) Gewichtsverlauf der Versuchsgruppe 2 im direkten Vergleich zur Versuchsgruppe 1** mit einem statistisch signifikanten Unterschied sowohl zwischen den Knockout-Tieren als auch zwischen den Wildtyp-Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe.

Überleben

In der Versuchsgruppe 2 mussten während des gesamten postoperativen Verlaufs über sieben Tage nach SAB von insgesamt 21 Mäusen acht Mäuse vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Hierbei handelte es sich um drei Mäuse aus der Knockout-Gruppe und fünf Mäuse aus der Wildtyp-Gruppe. Die Überlebensrate der Knock-out-Tiere der Versuchsgruppe 2 entsprach mit **70%** genau dem Durchschnitt bei diesem SAB-Modell (128). Bei den Wildtyp-Tieren lag sie mit **50%** deutlich darunter. Die Versuchsgruppe 1 zeigte eine Überlebensrate von **100%** bei den Wildtyp-Tieren und **87,5%** bei den Knockout-Tieren. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 1 (**100%**) und Versuchsgruppe 2 (**50%**) ($P=0,016$). Im Überleben der jeweiligen Knock-Out-Tiere zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

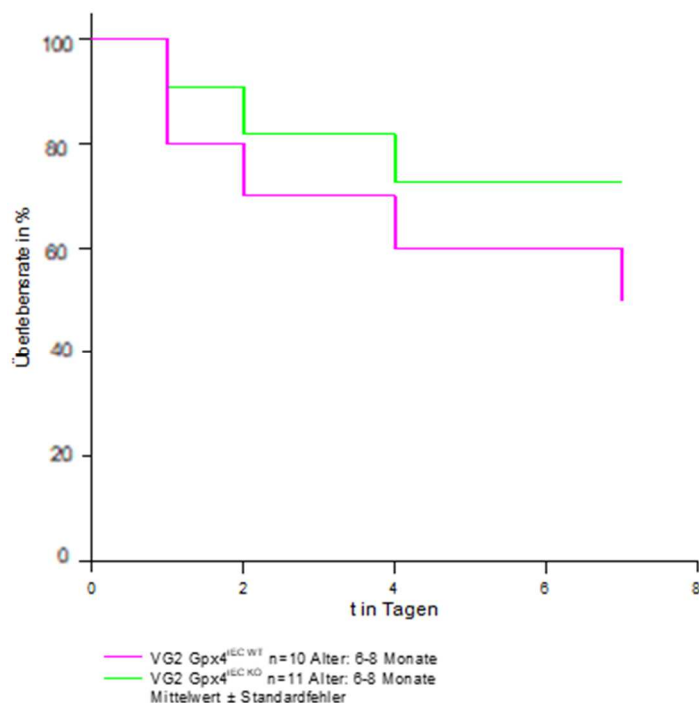


Abbildung 22 c.)
Überlebenskurven der Versuchsgruppe 2. In der Gruppe der Knockout-Tiere erreichten drei Tiere das Versuchsende nicht, wohingegen fünf Wildtyp-Tiere das Versuchsende nach sieben Tagen post-OP nicht erreichten.

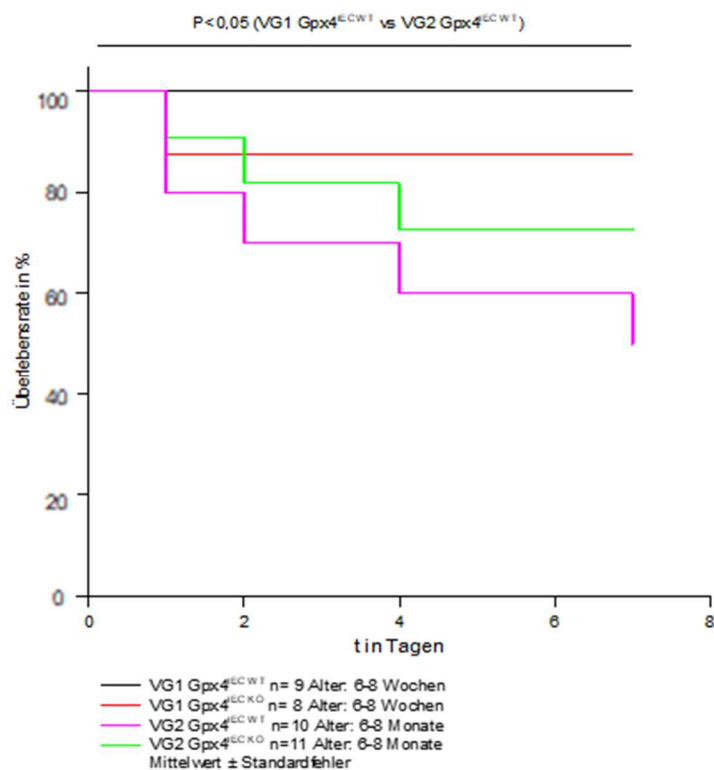


Abbildung 23 c.)
Überlebenskurven
der
Versuchsgruppe 2 im direkten
Vergleich zur Versuchsgruppe 1*
 mit einem statistisch signifikanten
 Unterschied zwischen den Wildtyp-
 Tieren der jeweiligen
 Versuchsgruppe.

3.2.3 Histologie

Neuronaler Zellschaden

Die Anzahl der untergegangenen Neuronen im Hippocampus- wurde analog zur Versuchsgruppe 1 sowohl für die ipsilaterale Schlaganfallseite als auch für die kontralaterale Seite ausgewertet. Bei den Wildtyp-Tieren waren auf der kontralateralen Seite etwa gleich viele Neurone in allen vier Hippocampus-Regionen gestorben (**48,7 \pm 10,4 Neurone**) wie auf der ipsilateralen Seite (**54,1 \pm 17,4 Neurone**). Bei den Knockout-Tieren konnte ein Unterschied zwischen ipsilateral und kontralateral beobachtet werden. Dort lag der Zelluntergang kontralateral in allen Hippocampus-Regionen bei **56,4 \pm 10,6 Neuronen** und ipsilateral bei **104,5 \pm 26,0 Neuronen**, was fast doppelt so viel war. Der Vergleich der einzelnen ipsilateralen Hippocampus-Regionen (CA1a, CA1b, CA2, CA3) zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß des neuronalen Zellschadens. In allen ipsilateralen Hippocampus-Regionen der Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere war jeweils annähernd die gleiche mittlere Anzahl an Neuronen untergegangen (Wildtyp-Tiere **CA1a 15,3 \pm 3,8, CA1b 14,5 \pm 4,5, CA2 12,5 \pm 3,0, CA3 11,9 \pm 2,4 Neurone**; Knockout-Tiere (**CA1a 27,2 \pm 6,6, CA1b 25,3 \pm 6,9, CA2 26,5 \pm 6,3, CA3 25,4 \pm 6,2 Neurone**). Wie erwartet, waren in der

Versuchsgruppe 2 insgesamt weniger Neurone auf der contralateralen als auf der ipsilateralen Seite untergegangen. Ein statistischer Unterschied des neuronalen Zellschadens in allen Hippocampus-Regionen, kontra- wie ipsilateral, zwischen Versuchsgruppe 1 und Versuchsgruppe 2 konnte nicht beobachtet werden.

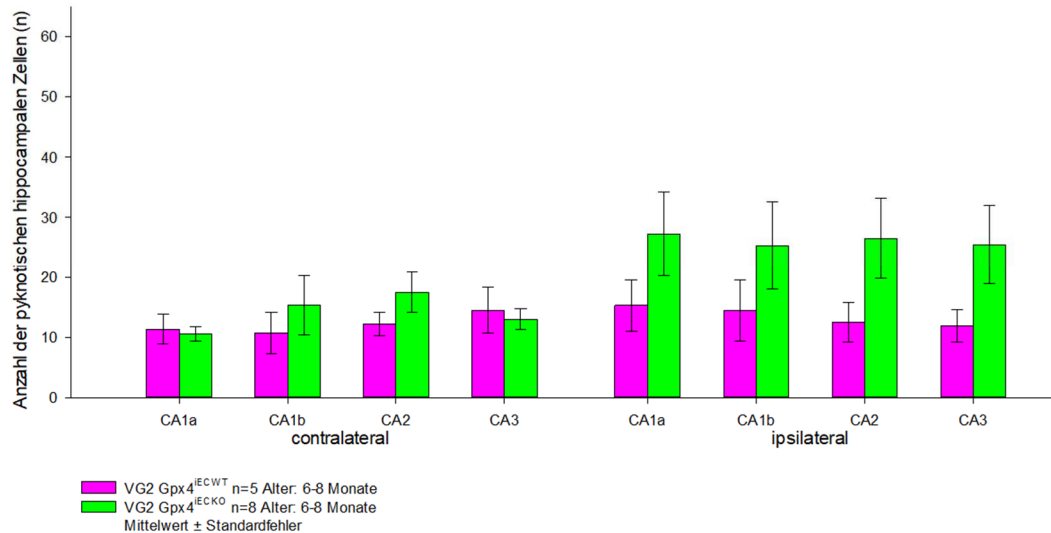


Abbildung 24. Neuronaler Zellschaden der Versuchsgruppe 2 kontra- (links) und ipsilateral (rechts) in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3. Für beide Gehirnhälften konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} detektiert werden.

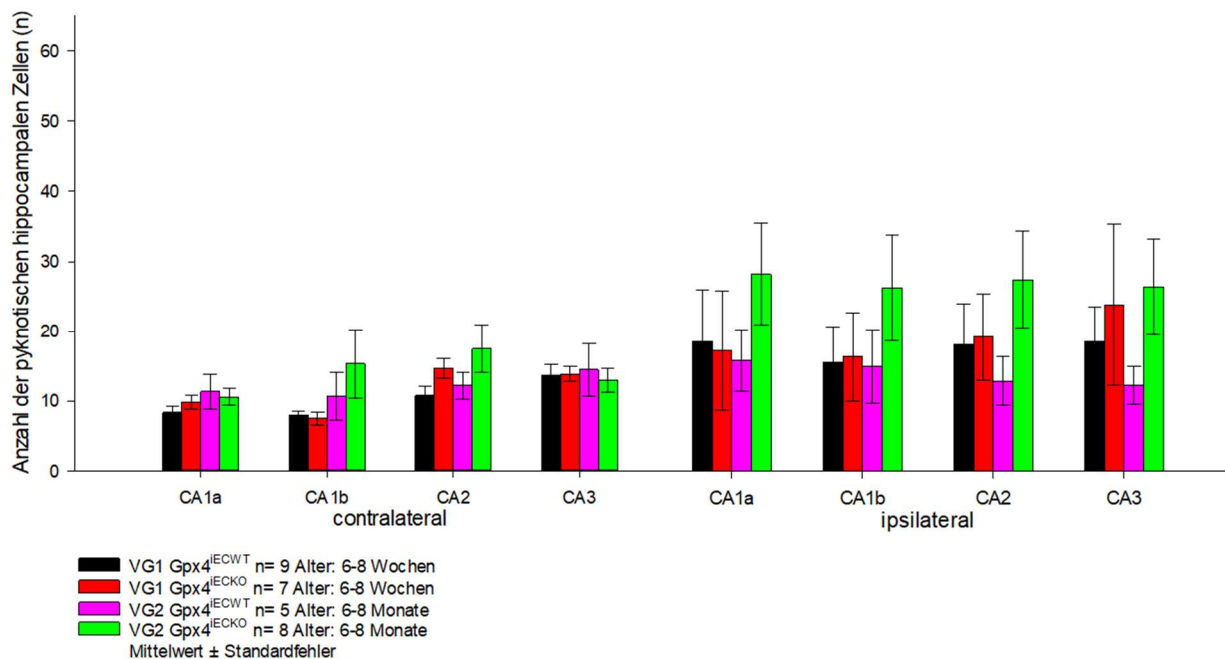


Abbildung 25. Neuronaler Zellschaden der älteren Versuchsgruppe 2 im Vergleich zur jüngeren Versuchsgruppe 1 in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3. Auch zwischen den Tieren der beiden Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

3.3 Versuchsgruppe 3: SAB bei Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO}-Tieren im Alter von sechs bis acht Wochen unter Vitamin E-Mangel

In den vorherigen Experimenten konnte man in den Versuchsgruppen 1 und 2 jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen den endothelialen Gpx4 Knockout- und den Wildtyp-Tieren nach SAB feststellen. Es wurde also ein neuer Versuchsansatz mit einem Vitamin-E-Mangel konzipiert, der ähnlich wie der Faktor „Alter“ in der vorhergehenden Versuchsgruppe 2 einen möglichen Unterschied zwischen den Gpx4 Knock-Out- und den Wildtyp-Tieren enttarnen sollte. Tiere gleichen Alters wie in der Versuchsgruppe 1 wurden in der folgenden Versuchsgruppe lediglich anders ernährt.

So wurden in einer weiteren Versuchsgruppe 3 jüngere Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen analysiert, die sofort nach dem Absetzen von den Muttertieren im Alter von drei bis vier Wochen bis zum Versuchsende eine Vitamin E-Mangel-Diät erhielten. Durch den so erreichten Mangel des direkten Gpx4-Synergisten sollte der oxidative Stress-Level in den Tieren vor SAB-Induktion zusätzlich erhöht werden, um mögliche Unterschiede im Outcome nach SAB zu erreichen. Parallel zum Beginn der Vitamin E-Mangel-Diät wurden die Gpx4 Knockout-Tiere sowie die wildtypischen Wurfgeschwister ebenfalls mit Tamoxifen behandelt, um den Knockout in diesen Tieren zu induzieren.

Es wurden insgesamt 24 Versuchstiere, **elf Gpx4^{IECWT}** und **13 Gpx4^{IECKO}** operiert.

3.3.1 Intraoperatives Monitoring

Abbildung 26 a-h. Zusammenstellung der intraoperativ erhobenen Daten. Abgebildet sind die während der SAB-Induktion erhobenen physiologischen Parameter der Versuchsgruppe 2. Die Daten wurden fünf Minuten vor bis 15 Minuten nach SAB-Induktion aufgezeichnet. Gpx4^{IECWT} sind in Orange dargestellt und Gpx4^{IECKO} in Blau.

Intrakranieller Druck (ICP)

Der Verlauf der ICP-Werte zeigte sich in dieser Versuchsgruppe zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren ähnlich. Bei gleichen Ausgangswerten lagen die maximalen ICP-Werte zum Zeitpunkt der SAB-Induktion für die Wildtyp-Tiere bei **68,2 ± 7,5 mmHg** und für die Knockout-Tiere bei **72,2 ± 10,8 mmHg**. Innerhalb der Beobachtungszeit von 15 Minuten fielen die ICP-Werte auf annähernd gleiche Endwerte von **27,2 ± 4,1 mmHg** bei den Wildtyp-Tieren und **26,4 ± 3,6 mmHg** bei den Knockout-Tieren. Die ICP-Werte der Vitamin E-defizienten Versuchsgruppe lagen somit zu OP-Ende deutlich höher als bei Versuchsgruppe 1, deren Tiere normales Futter erhielten. Dort lagen die finalen ICP-Werte bei **21,9 ± 1,0 mmHg** und

19,4 ± 2,0 mmHg bei einem vergleichbaren vorausgegangenen maximalen ICP-Wert von **68,5 ± 6,0 mmHg** und **58,2 ± 7,1 mmHg** bei SAB-Induktion.

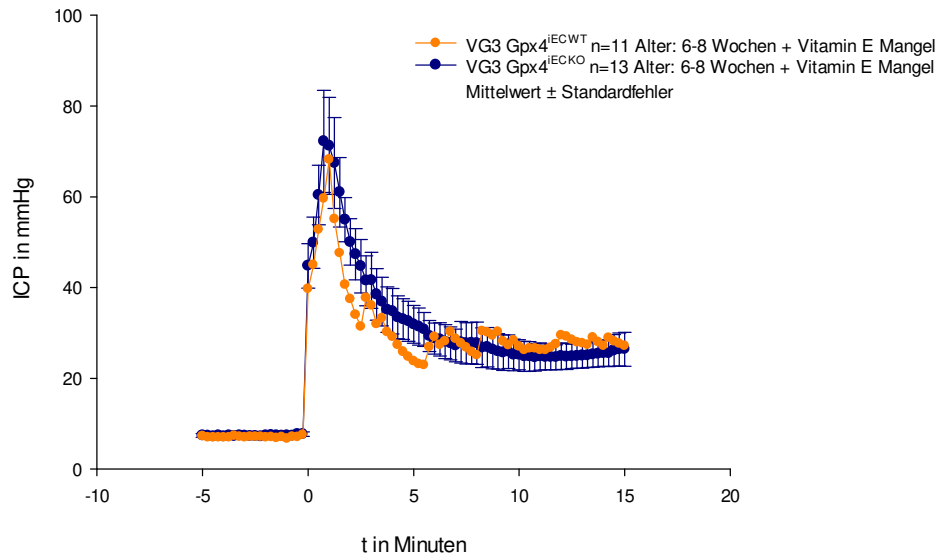


Abbildung 26 a.) ICP der Versuchsgruppe 3 mit einem deutlichen Peak bei SAB-Induktion zum Zeitpunkt null.

Nachblutungen

In der Versuchsgruppe 3 hatten von den elf Wildtyp-Tieren vier Tiere eine oder zwei Nachblutungen, was **0,64 ± 0,27** Nachblutung pro Tier entsprach. Von den 13 Knockout-Tieren hatten drei Tiere eine Nachblutung, was **0,23 ± 0,12** Nachblutung pro Tier entsprach. Dies entspricht einer **36%**igen Nachblutungsrate bei den Wildtyp-Tieren und einer **23%**igen bei den Knockout-Tieren. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 3. Bei den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 1 gab es **0,22 ± 0,14** Nachblutung pro Tier und eine **22%**ige Nachblutungsrate und beiden Knockout-Tieren **0,25 ± 0,15** Nachblutung pro Tier eine **25%**ige Nachblutungsrate. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Versuchsgruppe 1 und der Versuchsgruppe 3, die mit Vitamin E-armen Futter gefüttert wurde.

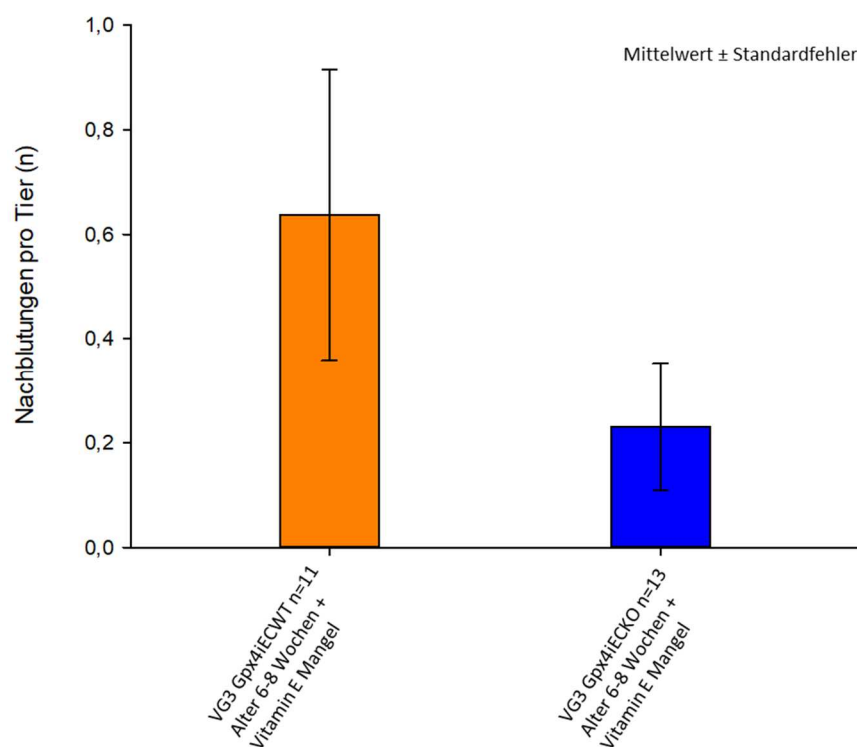


Abbildung 26 b.)
Darstellung der
Nachblutungen pro Tier
der Versuchsgruppe 3.
 Der beobachtete Unterschied in den Nachblutungen zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} zeigte sich als nicht statistisch signifikant.

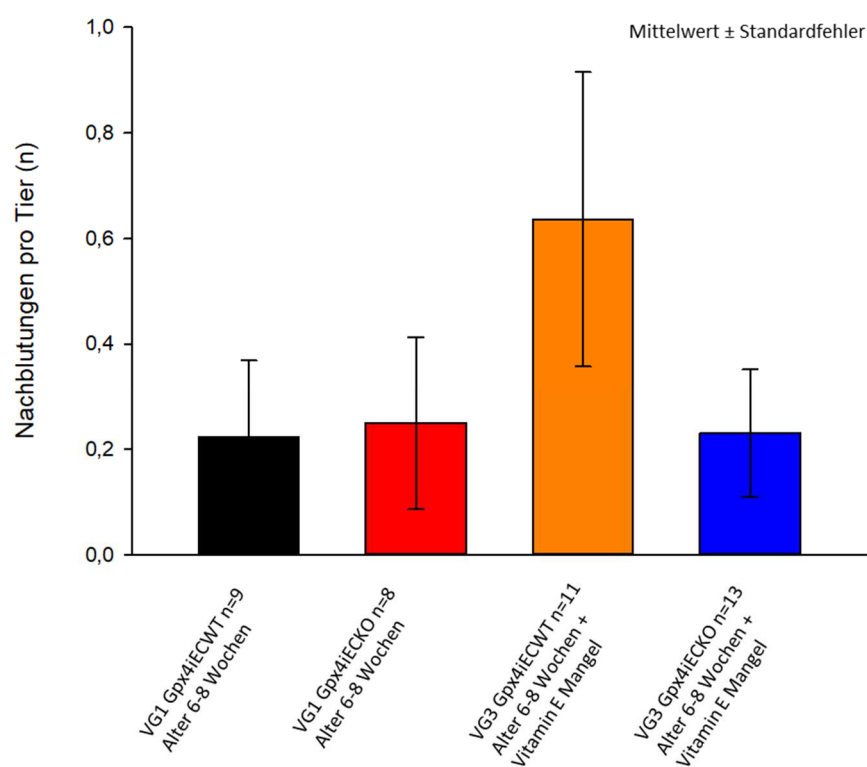


Abbildung 26 c.)
Darstellung der
Nachblutungen pro Tier
der Versuchsgruppe 1
und 3. Der beobachtete Unterschied in den Nachblutungen zwischen Gpx4^{IECWT} und Gpx4^{IECKO} der beiden Versuchsgruppen zeigte sich als nicht statistisch signifikant.

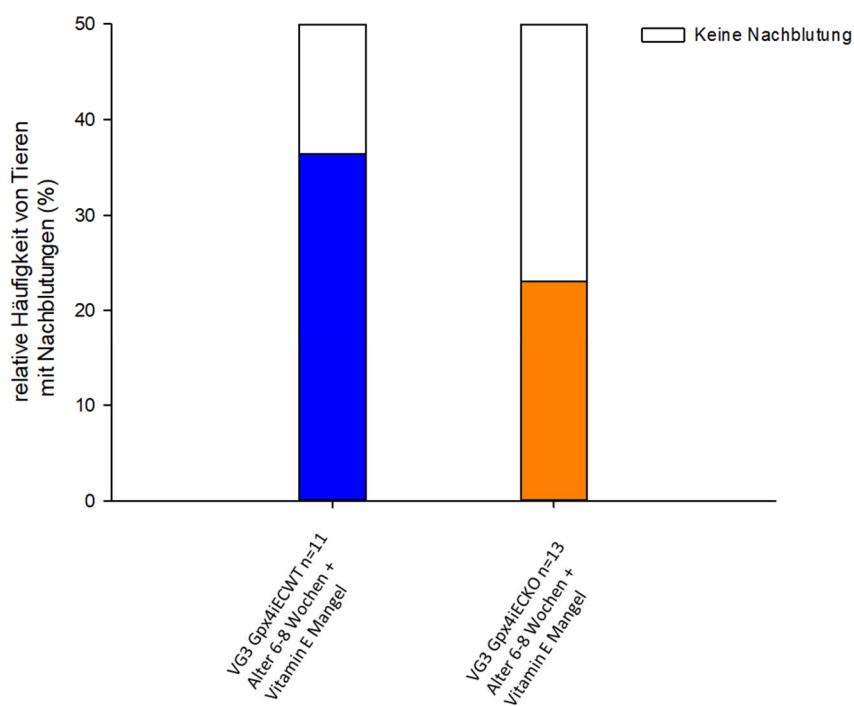


Abbildung 26 d.) Darstellung der relativen Häufigkeit von Tieren mit Nachblutungen der Versuchsgruppe 3.

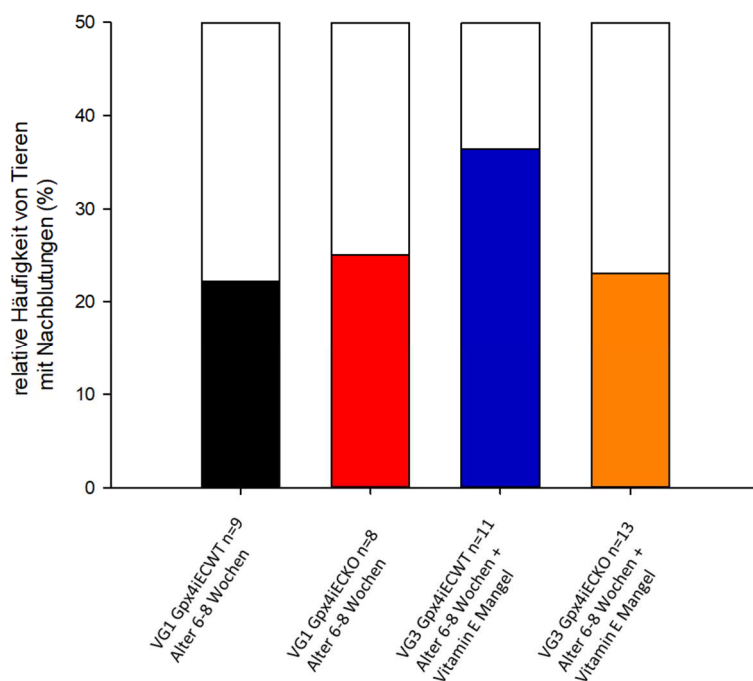


Abbildung 26 e.) Darstellung der relativen Häufigkeit von Tieren mit Nachblutungen der Versuchsgruppe 1 und 3.

Regionale zerebrale Durchblutung (rCBF)

Die rCBF-Werte der Vitamin E-gemangelten Wildtyp- und Knockout-Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einem deutlichen Abfall der Werte auf $25,9 \pm 6,2\%$ für die Wildtyp-Tiere und auf $31,2 \pm 5,9\%$ bei den Knockout-Tieren bei SAB-Auslösung und einem schließenden Anstieg auf $65,8 \pm 6,8\%$ (Wildtyp) und $67,2 \pm 7,3\%$ (Knockout) des Ursprungswertes. Ähnliche rCBF-Werte wurden auch bei Versuchsgruppe 1 registriert. Dort fielen allerdings die rCBF-Werte weniger stark nach SAB und erreichten $37,2 \pm 7,3\%$ (Wildtyp) und $50,7 \pm 9,7\%$ (Knockout) des Ausgangswertes.

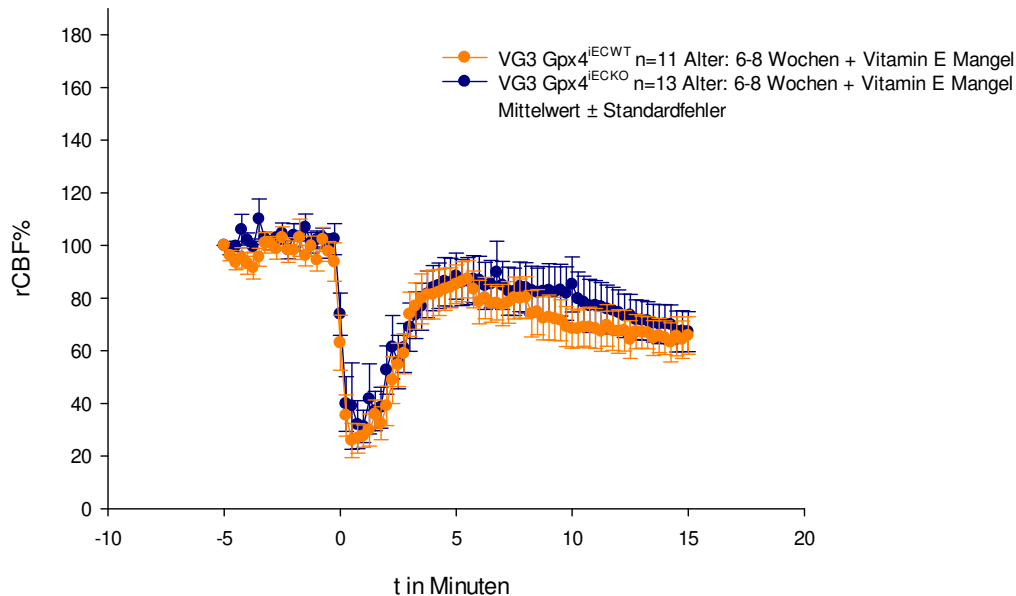


Abbildung 26 f.) LDF der Versuchsgruppe 3 mit einer Senkung am Zeitpunkt null unmittelbar nach einer SAB-Induktion

Endtidaler Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)

Der end-tidale pCO₂ zeigte bei den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 3 einen Anstieg von $25,1 \pm 1,0$ mmHg auf $29,5 \pm 1,6$ mmHg unmittelbar nach der SAB-Induktion, sowie einen etwas moderateren Anstieg bei den Knockout-Tieren von $26,2 \pm 0,8$ mmHg auf $27,0 \pm 1,1$ mmHg. Im weiteren Verlauf fielen die pCO₂-Werte stetig und erreichten Endwerte von $22,8 \pm 0,8$ mmHg bei den Wildtyp-Tieren und $24,1 \pm 0,8$ mmHg bei den Knockout-Tieren.

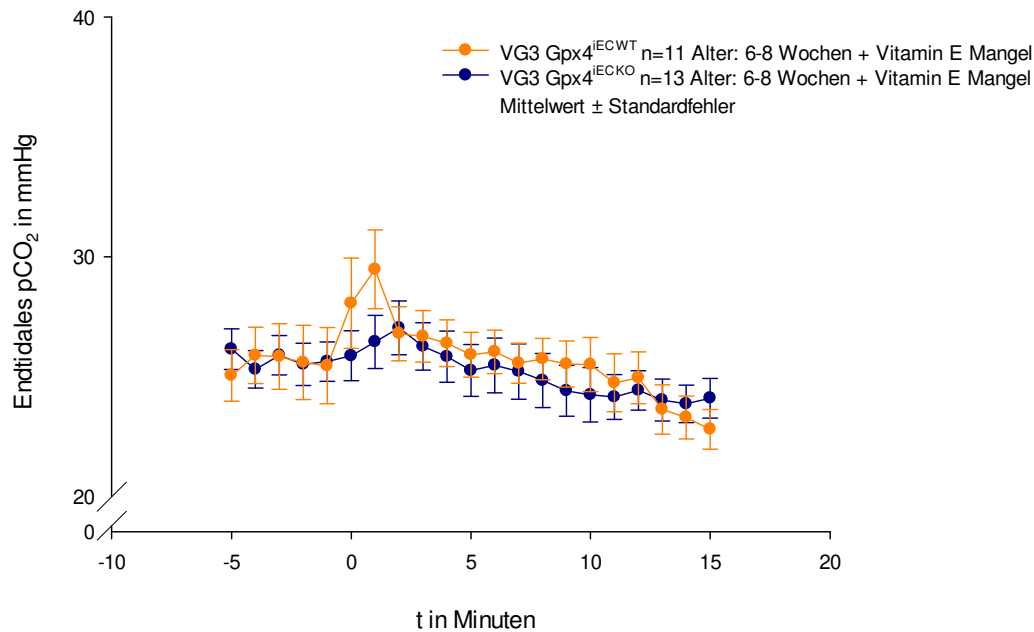


Abbildung 26 g.) Endtidales $p\text{CO}_2$ der Versuchsgruppe 3.

Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Versuchsgruppe 3 blieb während der OP-Dauer auch hier wieder konstant. Sowohl für die Wildtyp-Tiere als auch für die Knockout-Tiere betrug die Temperatur über den gesamten Überwachungszeitraum rund 37,1°C ohne signifikante Veränderungen nach Induktion der SAB.

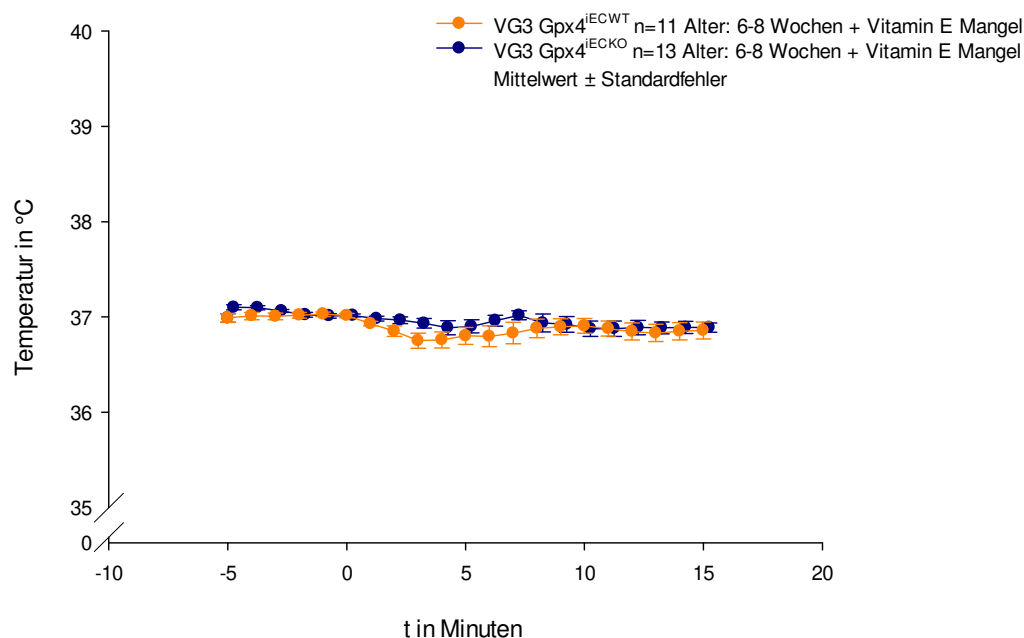


Abbildung 26 h.) Körpertemperatur der Versuchsgruppe 3. Auch die Werte für die Körpertemperatur lagen bei beiden Tiergruppen während der OP-Dauer im Normbereich.

3.3.2 Outcome nach SAB

Neurologische Funktionen

Auch die Versuchsgruppe 3 zeigte vor SAB einen guten neurologischen Status und einen niedrigen Ausgangs-Score. Nach SAB kam es auch bei den Vitamin E-gemangelten Tieren der Versuchsgruppe 3 erwartungsgemäß zu einer deutlichen Verschlechterung der neurologischen Funktionen. So erzielten die Wildtyp-Tiere einen Tag nach SAB-Induktion einen mittleren Score von **9,8 ± 2,1 Punkten**, während die Knockout-Tiere einen nochmals deutlich schlechteren Score von **13,1 ± 1,2 Punkten** erreichten. Bei der Versuchsgruppe 1 waren die entsprechenden Werte am ersten postoperativen Tag **4,1 ± 1,2 Punkte** und **6,5 ± 0,9 Punkte**. Im weiteren postoperativen Verlauf zeigten auch die Tiere dieser Versuchsgruppe eine deutliche Besserung der neurologischen Defizite und erreichten einen mittleren Score von **3,7 ± 2,1 Punkten** für die Wildtyp-Tiere und von **1,7 ± 1,0 Punkten** für die Knockout-Tiere. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen lag nicht vor. Bei der Versuchsgruppe 1 waren die Werte am letzten Versuchstag entsprechend **1,9 ± 1,0** und **2,0 ± 1,1**.

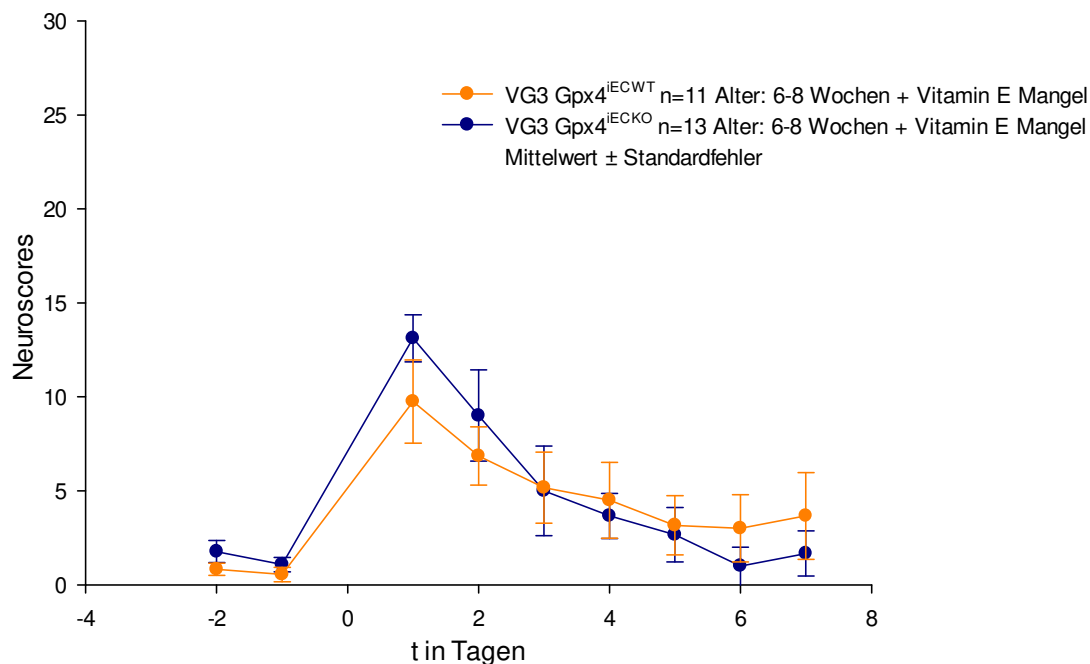


Abbildung 27 a.) Neuroscores der Versuchsgruppe 3.

Überraschenderweise zeigten die Vitamin E-gemangelten Wildtyp-Tiere mit einem Score von **9,8 ± 2,1 Punkten** ein deutlich stärkeres neurologisches Defizit am Tag 1 nach SAB gegenüber den normal gefütterten Wildtyp-Tieren aus Versuchsgruppe 1, die einen Score von **4,1 ± 1,2 Punkten** erzielten. Auch der Score-Wert der Knockout-Tiere unter Vitamin E-Mangel lag am

ersten postoperativen Tag mit **13,1 ± 1,2 Punkten** deutlich über dem Score der Knockout-Tiere unter normaler Diät mit **6,5 ± 0,9 Punkten**. Im weiteren postoperativen Verlauf verbesserte sich das neurologische Defizit auf annähernd gleiche Score-Werte in allen Gruppen, wobei diese bei allen noch geringfügig über dem Ausgangswert lagen.

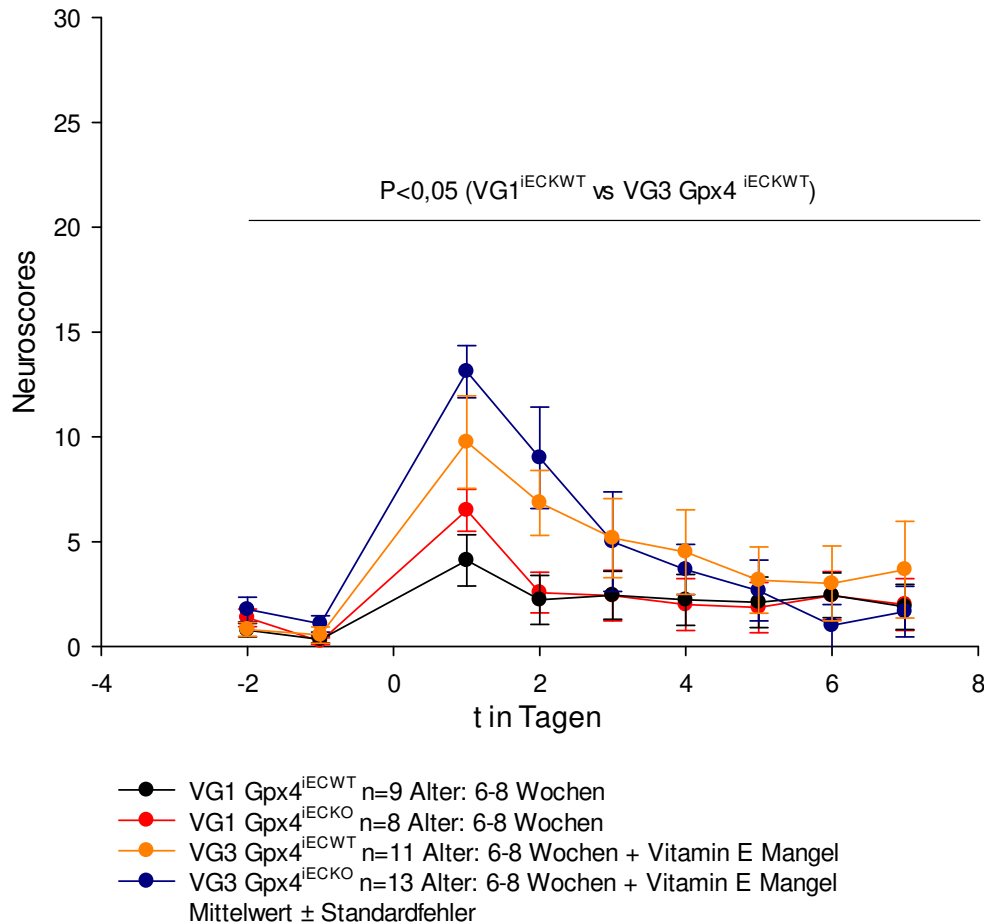


Abbildung 28 a.) Neuroscores der Versuchsgruppe 1 und 3 ** im Vergleich. Die Vitamin E-gemangelten Wildtyp-Tiere (Versuchsgruppe 3) zeigten ein signifikant höheres neurologisches Defizit als die Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 1, die normales Standardfutter erhielten.

Körpergewicht

Im Gewichtsverlauf der Vitamin-E-gemangelten Versuchsgruppe 3 zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gpx4 Wildtyp-Tieren und Gpx4 Knockout-Tieren. Die Knockout-Tiere hatten bereits mit durchschnittlich **20,0 ± 0,6 g** ein höheres Ausgangsgewicht als die Wildtyp-Tiere mit durchschnittlich **18,8 ± 0,7 g**. Auch bei diesen Tieren kam es unmittelbar nach SAB zu einem deutlichen Gewichtsverlust auf **16,6 ± 1,6 g** bei den Wildtypen und **18,2 ± 2,0 g** bei den Knockouts am zweiten postoperativen Tag. Der Gewichtsverlust hielt bis zum vierten postoperativen Tag an und sank auf Werte von **15,6 ± 1,6 g** bei den Wildtyp-

Tieren und $17,0 \pm 2,5$ g bei den Knockout-Tieren. Das durchschnittliche Gewicht bei Versuchsende lag bei den Wildtyp-Tieren bei $17,7 \pm 1,1$ g und bei den Knockout-Tieren bei $19,5 \pm 0,9$ g.

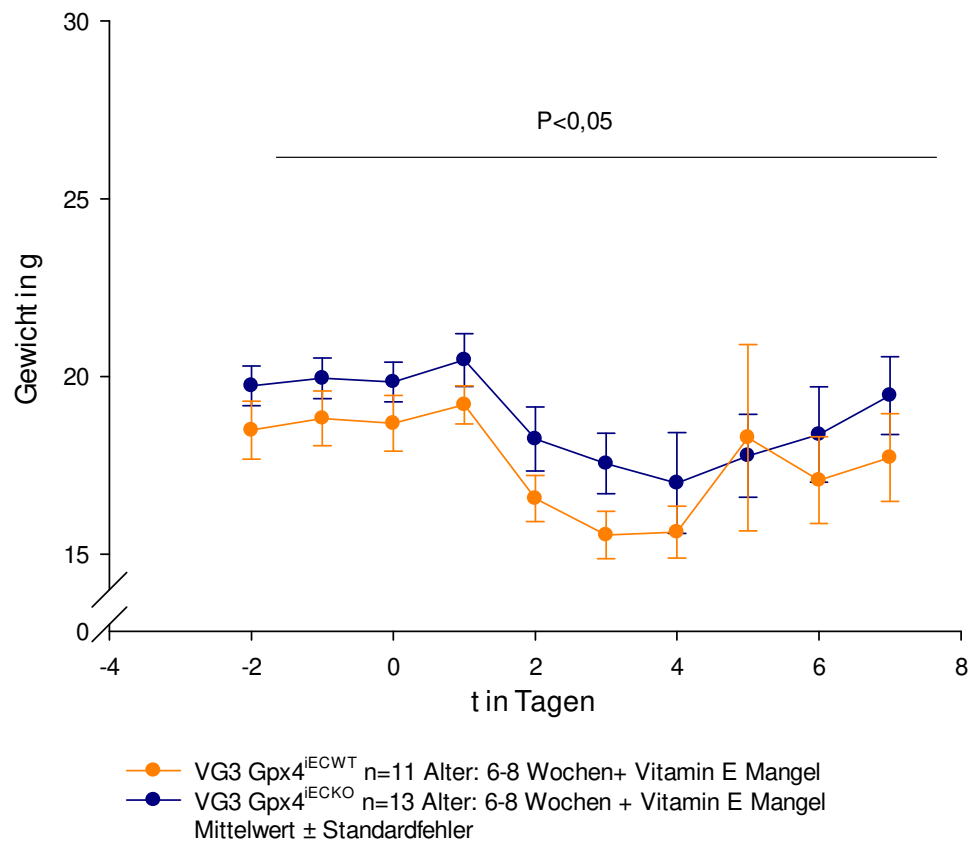


Abbildung 27 b.) Gewichtsverlauf der Versuchsgruppe 3 mit einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gpx4 Wildtyp- und Knockout-Tieren.

Der Vergleich des Körpergewichts der Tiere aus Versuchsgruppe 1 und Versuchsgruppe 3 ergab mehrere statistisch signifikante Unterschiede. So hatten die mit Standard-Diät gefütterten Wildtypen der Versuchsgruppe 1 im Gegensatz zu den Vitamin E-gemangelten Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 3 ein signifikant höheres Ausgangsgewicht vor SAB-Induktion ($20,8 \pm 0,8$ g vs. $18,5 \pm 0,8$ g). Dieser signifikante Gewichtsunterschied war über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten (Tag vier post-OP $18,2 \pm 0,1$ g vs. $15,6 \pm 0,7$ g und Tag sieben post-OP $19,2 \pm 0,9$ g vs. $17,7 \pm 2,8$ g). Bei den Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 1 und Versuchsgruppe 3 konnte ebenfalls ein deutlicher Gewichtsunterschied detektiert werden; der größte Unterschied zeigte sich dabei am vierten postoperativen Tag mit einem mittleren Gewicht von $16,6 \pm 0,9$ g in der Versuchsgruppe 1 und $17,0 \pm 1,2$ g in der Versuchsgruppe 3.

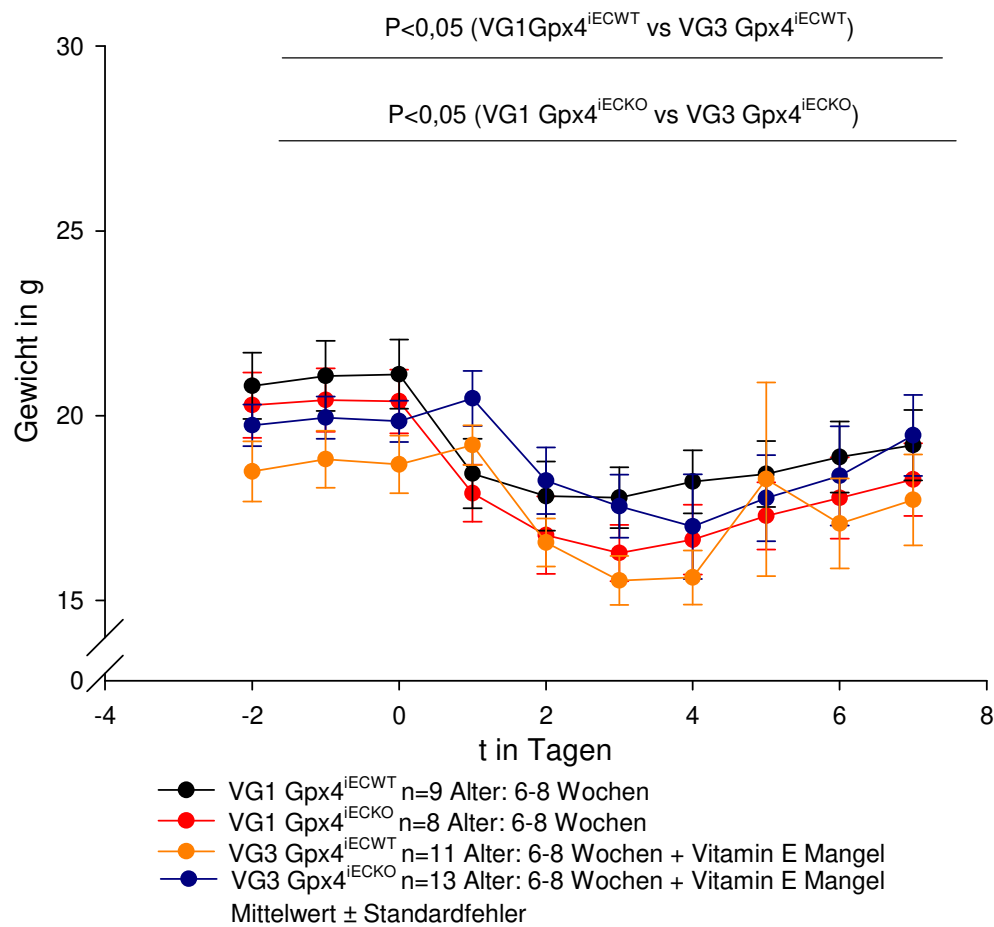


Abbildung 28 b.) Gewichtsverlauf der Versuchsgruppe 3 im Vergleich zur Versuchsgruppe 1 mit einem statistisch signifikanten Unterschied sowohl zwischen den Knockout- als auch zwischen den Wildtyp-Tieren beider Versuchsgruppen.

Überleben

In Versuchsgruppe 3 mussten während des gesamten postoperativen Verlaufs über sieben Tage nach SAB von insgesamt 24 Mäusen 15 Mäuse vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Hierbei handelte es sich um zehn Mäuse aus der Knockout-Gruppe und fünf Mäuse aus der Wildtyp-Gruppe. Die Überlebensrate der Vitamin-E-gemangelten Tiere lag sowohl bei den Wildtyp-Tieren mit **55%**, als auch bei den Knockout-Tieren mit **23%** deutlich unter der durchschnittlichen Überlebensrate von 70% bei diesem intraluminalen SAB-Induktionsmodell (128).

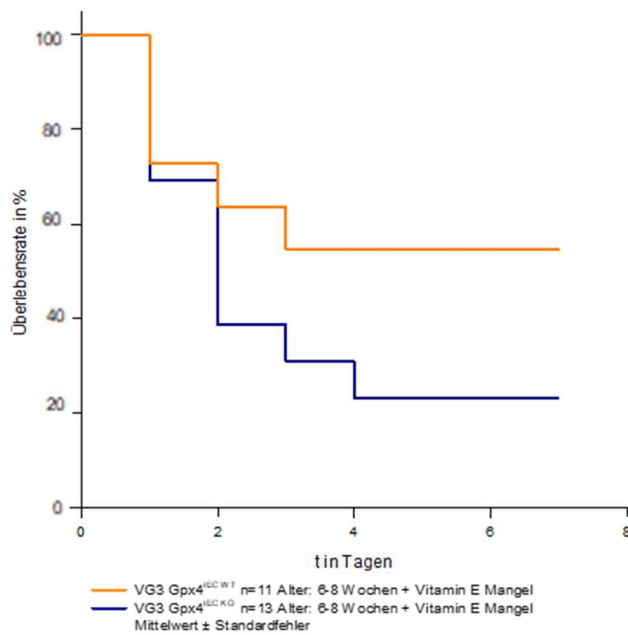


Abbildung 27 c.) Überlebenskurven der Vitamin E-gemangelten Versuchsgruppe 3

Im direkten Vergleich mit den Tieren der Versuchsgruppe 1, die normales Standard-Futter erhielten und eine Überlebensrate von **100%** für die Wildtyp-Tiere und knapp **88%** für die Knockout-Tiere aufwiesen, ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied beim Überleben nach SAB zwischen Vitamin E-gemangelten und Standard-gefütterten Tieren.

$P < 0,05$ (VG1 Gpx4^{ECKO} vs VG3 Gpx4^{ECKO})

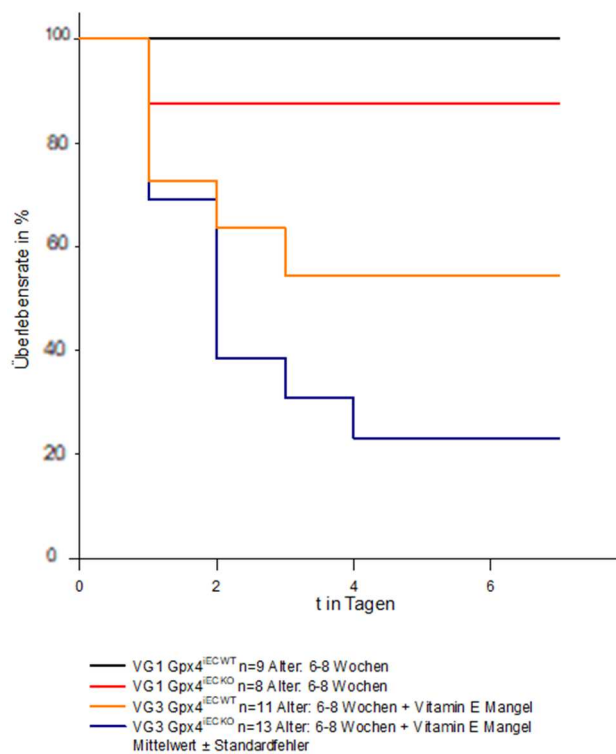


Abbildung 28 c.) Überlebenskurven der Versuchsgruppe 3 im Vergleich zur Versuchsgruppe 1* mit einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Knockout-Tieren der beiden Versuchsgruppen.

3.3.4 Histologie

Neuronaler Zellschaden

Bei den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 3 war die Anzahl der untergegangenen Neuronen auf beiden Gehirnseiten etwa gleich groß. Auf der kontralateralen Seite waren es insgesamt **118,0 ± 51,2 Neurone** und auf der ipsilateralen Seite **115,3 ± 31,6 Neurone** ohne signifikante Unterschiede in den einzelnen ausgewählten Regionen.

Dagegen zeigten die Knockout-Tiere deutlich mehr untergegangene neuronale Zellen auf der ipsilateralen Seite (**76,5 ± 31,9 Neurone**) gegenüber der kontralateralen Seite (**54,4 ± 6,48 Neurone**). Auch hier konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den beiden Seiten festgestellt werden. Die Unterschiede im neuronalen Zellschaden der einzelnen Regionen zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren waren beidseits nicht statistisch signifikant.

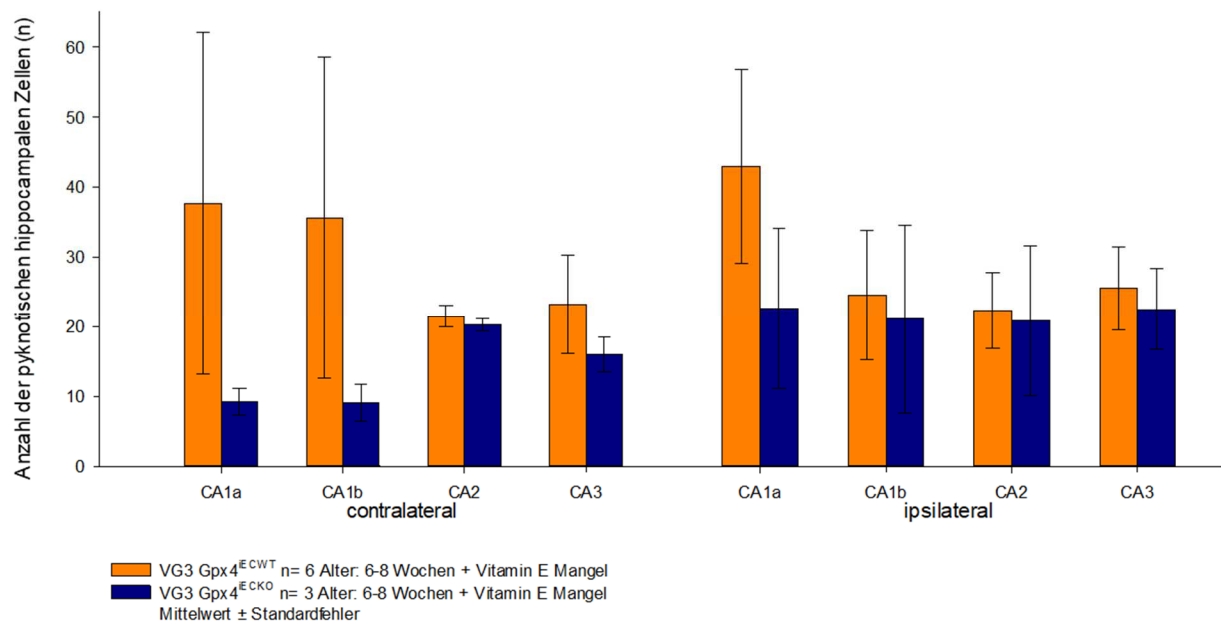


Abbildung 29. Neuronaler Zellschaden der Versuchsgruppe 3 kontra- (links) und ipsilateral (rechts) in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3. Für beide Gehirnhälften konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gpx4^{ECWT} und Gpx4^{ECKO} detektiert werden.

Zwischen den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 1 und den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 3 gab es nur auf der kontralateralen Seite in der Region CA2 einen statistisch signifikanten Unterschied (**10,8 ± 1,2 Neurone** gegenüber **21,5 ± 1,4 Neuronen**). In allen anderen Regionen ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede. Es gab lediglich eine insgesamt höhere Anzahl untergegangener Zellen auf der ipsi- gegenüber der kontralateralen Seite.

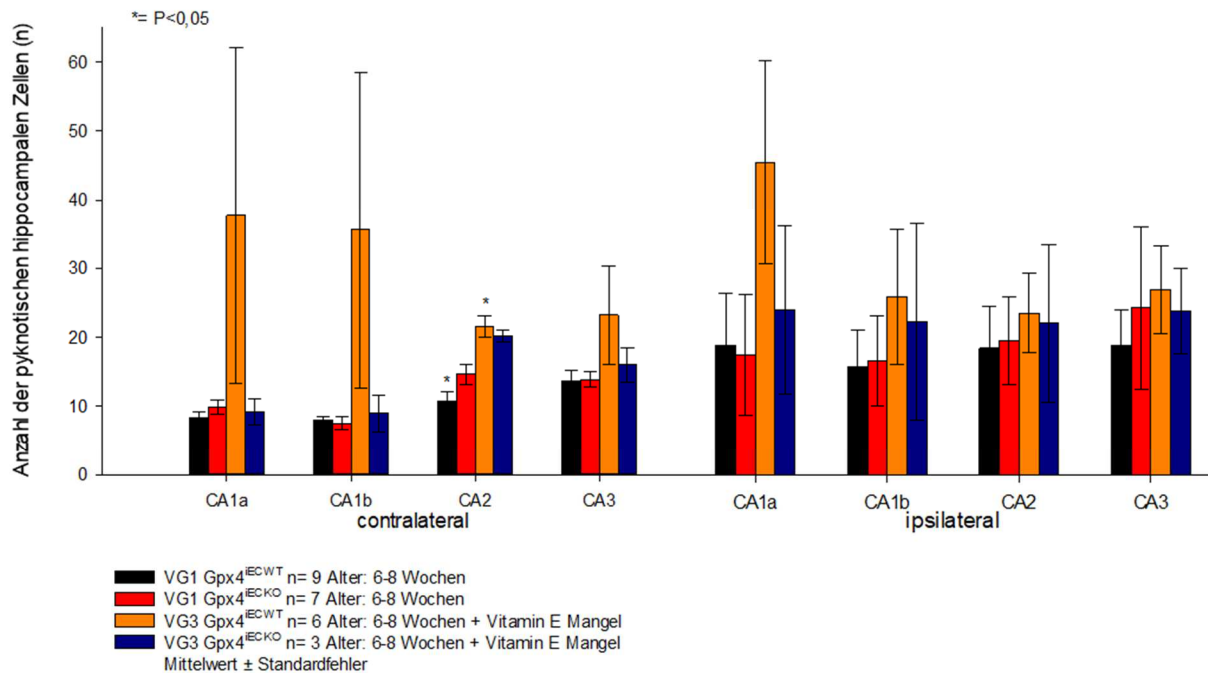


Abbildung 30. Neuronaler Zellschaden der Vitamin E-gemangelten Versuchsgruppe 3 im Vergleich zur jüngeren Versuchsgruppe 1 in den Hippocampus-Regionen CA1a, CA1b, CA2 und CA3. In der Region CA2 konnte bei Vergleich der Wildtyp-Tiere der beiden Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Hydrozephalus

Das Ausmaß des Hydrozephalus, gemessen am Anteil der Ventrikel an der gesamten Gehirnofläche, lag bei den Wildtyp-Tieren der Versuchsgruppe 3 bei $2,2 \pm 0,2\%$ und bei den Knockout-Tieren bei $2,9 \pm 0,1\%$ ohne signifikante Unterschiede.

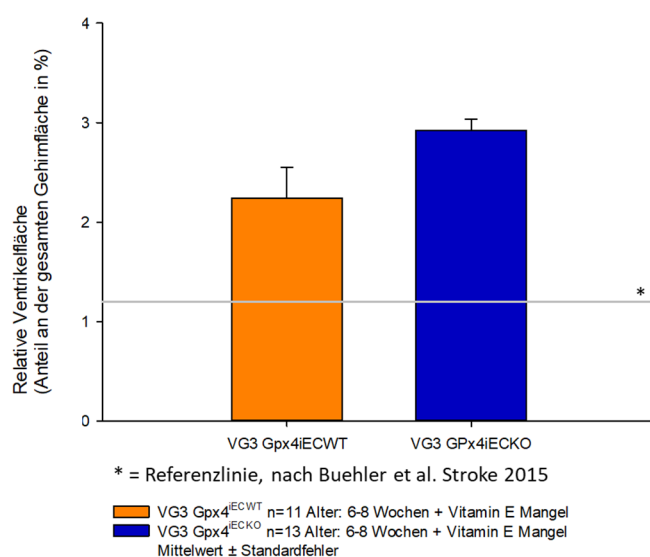


Abbildung 31. Hydrozephalus der Versuchsgruppe 3. Ausmaß des Hydrozephalus der Versuchsgruppe 3, gemessen am Anteil der beiden Ventrikel an der gesamten Gehirnofläche der Wildtyp-Tiere (orange) und der Knockout-Tiere (blau).

Bei den Wildtyp-Mäusen der Versuchsgruppe 3 zeigte sich somit der relative Ventrikelanteil ($2,24 \pm 0,29\%$) fast identisch mit dem relativen Ventrikelanteil der Wildtyp-Tiere der ersten Versuchsgruppe ($2,24 \pm 0,26\%$). Verglichen mit der Versuchsgruppe 1, die die Standard-Diät erhielt, zeigten zwar die Vitamin E-gemangelten Knockout-Tiere der Versuchsgruppe 3 einen geringfügig stärker ausgeprägten Hydrozephalus, statistisch erwies sich der Unterschied allerdings als nicht signifikant. Der relative Ventrikelanteil lag dabei bei $1,73 \pm 0,26\%$ bei den Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 1 und bei $2,92 \pm 0,09\%$ bei den Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 3.

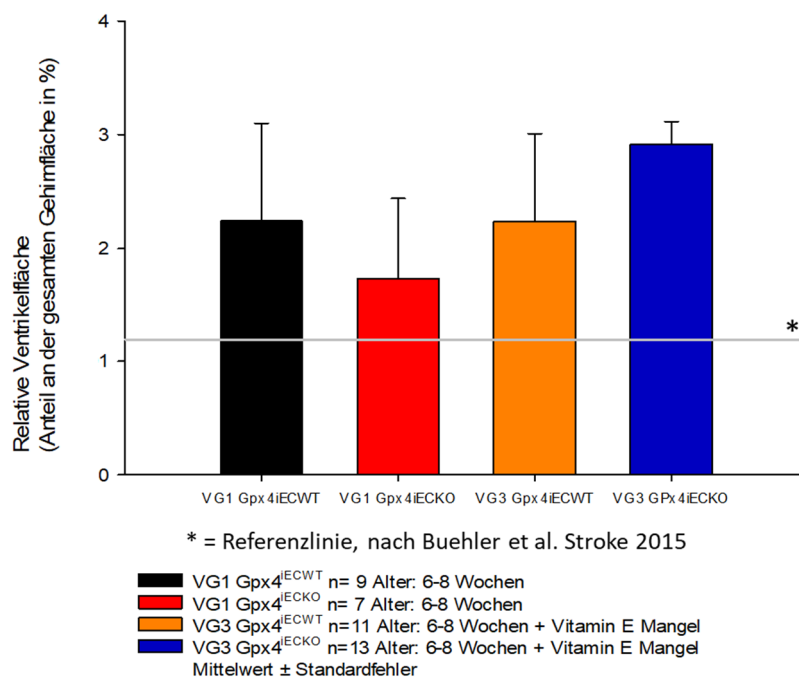


Abbildung 32.
Hydrozephalus der Versuchsgruppe 3 im Vergleich zur Versuchsgruppe 1. Bei der Ausprägung des Hydrozephalus in beiden Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Schädigung der weissen Substanz

Bei den sechs überlebenden Wildtyp-Mäusen der Versuchsgruppe 3, bei denen auch die histologische Analyse durchgeführt wurde, zeigte sich bei der Hälfte der Tiere die ipsilaterale Seite stärker geschädigt. Dieser Schaden zeigte sich in einer reduzierten Dicke des Corpus Callosum. Die Dicke des Corpus Callosum diente als Hinweis für den Grad der Schädigung der weißen Substanz – je dünner, desto größer die Schrumpfung der weißen Substanz.

Bei der anderen Hälfte der Mäuse lag die stärkere Schädigung dagegen auf der kontralateralen Seite.

Bei den drei überlebenden Knockout-Mäusen der Versuchsgruppe 3 wies die ipsilaterale Seite eine stärkere Schrumpfung des Corpus Callosum gegenüber der kontralateralen Seite auf ($360,4$; $381,3$ und $447,6 \mu\text{m}$ versus $404,3$; $407,0$ und $513,4 \mu\text{m}$).

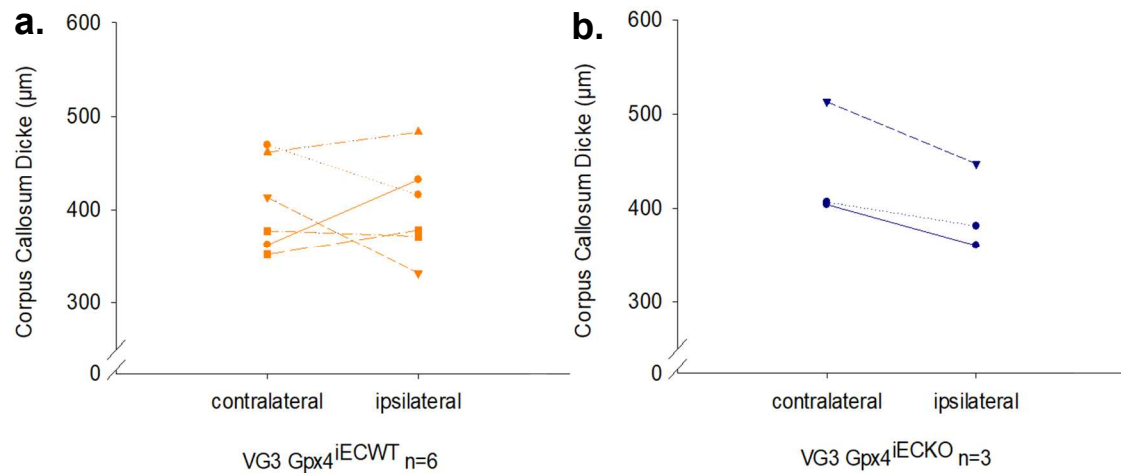


Abbildung 33 a-b. Bestimmung der Dicke des Corpus Callosum der Versuchsgruppe 3.

a.) Dicke des Corpus Callosum der kontra- und ipsilateralen Seite bei den Wildtyp-Tieren.

b.) Dicke des Corpus Callosum der kontra- und ipsilateralen Seite bei den Knockout-Tieren

Verglichen mit den Tieren Versuchsgruppe 1, die Standard-Diät erhielten, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Dicke des Corpus Callosum zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren der beiden Versuchsgruppen.

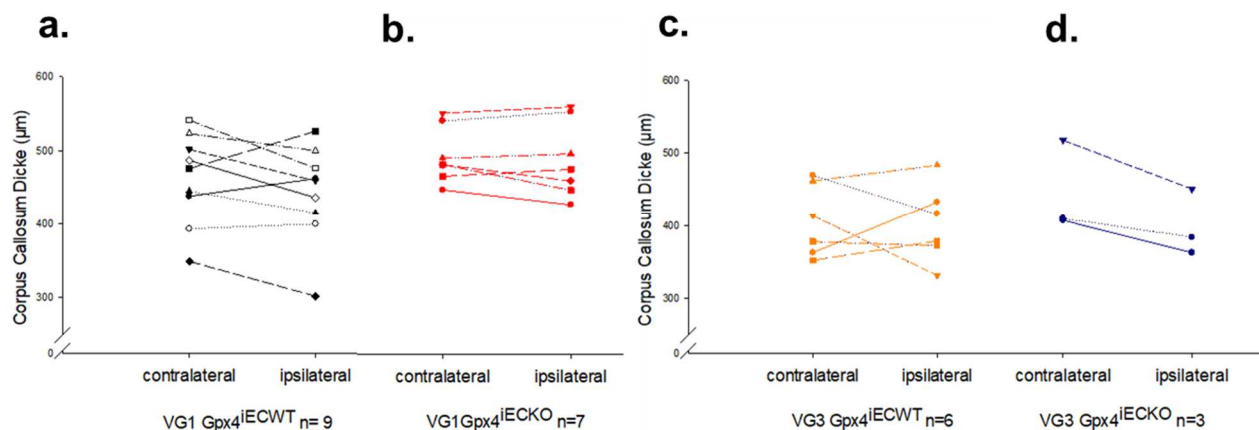


Abbildung 34 a-d. Dicke des Corpus Callosum der Versuchsgruppe 3 verglichen mit Versuchsgruppe 1. a) Corpus Callosum Dicke der Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 1 (schwarz)

b) Corpus Callosum Dicke der Knockout-Tiere der Versuchsgruppe 1 (rot)

c) Corpus Callosum Dicke der Wildtyp-Tiere der Versuchsgruppe 3 (orange)

d) Corpus Callosum Dicke der Knockout-Tiere der Versuchsgruppe 3 (blau)

Zur Beurteilung der Schädigung der weißen Substanz ipsilateral versus kontralateral wurden die Dicken des Corpus Callosum beider Seiten zueinander ins Verhältnis gesetzt, jeweils bei den **Gpx4^{iECWT} (orange)** und bei den **Gpx4^{iECKO} (blau)**.

Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Dicke des Corpus Callosum (ipsi- zu kontralateral) zwischen den Wildtyp-Tieren- ($1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$) und Knockout-Tieren der Versuchsgruppe 3 ($0,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$).

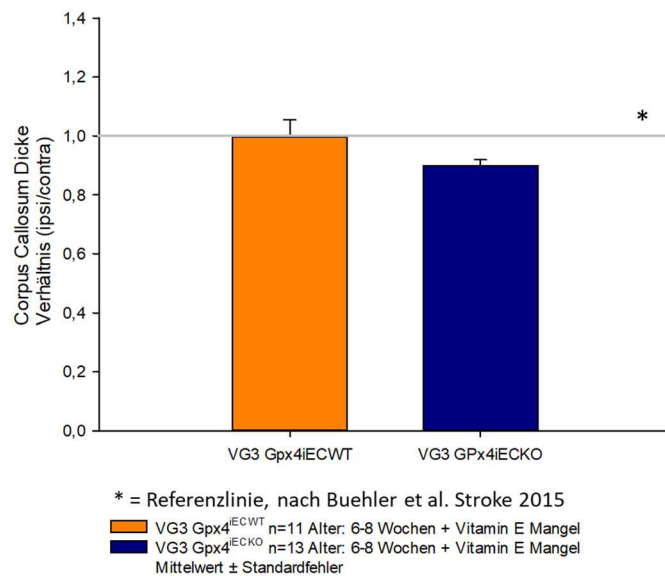


Abbildung 35. Verhältnis Corpus Callosum Dicke ipsi- zu kontralateral der Versuchsgruppe 3.

Im Vergleich vom Verhältnis der Corpus Callosum Dicke ipsi- zu kontralateral der Versuchsgruppe 3 mit der Versuchsgruppe 1 ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren. Vielmehr erhielt man vergleichbare Werte bei allen vier Tiergruppen: $1,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$, $1,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$, $1,00 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $0,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$.

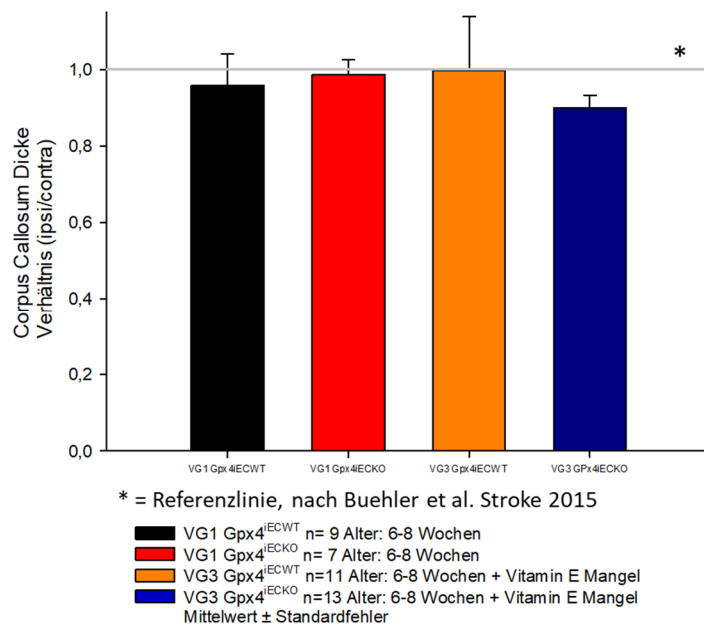


Abbildung 36. Verhältnis Corpus Callosum Dicke ipsi- zu kontralateral der Versuchsgruppe 3 im Vergleich zu Versuchsgruppe 1.

Der Grad der Schädigung der weißen Substanz war in beiden Versuchsgruppen, sowie jeweils für Gpx4^{IECWT} und bei den Gpx4^{IECKO} gleich ausgeprägt.

4 Diskussion

4.1 Methoden und Material

Maus als Versuchstier

Die Verwendung der Maus als Versuchstier für die biomedizinische Forschung hat viele Vorteile, u.a. in der kurzen Gestationszeit dieser Spezies und somit schneller Zucht. Weiter ist dank ihrer kleinen Größe und ihres niedrigen Gewichts das Halten von vielen Tieren auf relativ kleinem Raum möglich. Auch die verhältnismäßig begrenzten Kosten für Erwerb und Haltung der Mäuse machen sie für die experimentelle Forschung attraktiv. Mäuse bieten zudem mittlerweile zahlreiche Möglichkeiten der genetischen Manipulation, wie beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete Cre-loxP-System.

Es werden darüber hinaus verschiedenste spezielle Futtermittel für Nager kommerziell angeboten, was eine vitaminreduzierte Diät, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, relativ leicht möglich machte. Dank ihrer Kompaktheit lassen sich an Mäusen täglich nötige Manipulationen, wie beispielsweise die Durchführung neurologischer Tests oder das Wiegen verhältnismäßig schnell und einfach durchführen.

Andererseits hat ein Mausmodell auch auf der Hand liegende Nachteile. Mäuse entwickeln im Gegensatz zu vielen SAB-Patienten keine Gefäßvorschädigungen aufgrund jahrelanger arterieller Hypertonie oder Diabetes (45), was die Übertragung der Ergebnisse auf die humane Medizin einschränkt. Auch intrakranielle Aneurysmen, Hauptursache der SAB, entstehen bei Mäusen nicht per se, sondern müssen experimentell induziert werden (133).

Die kleine Größe der Mäuse hat neben den offensichtlichen Vor- auch einige Nachteile. Ihr kleiner Kopf und die nur einige Millimeter im Durchmesser messende Arterien machen das Einbringen des Prolene-Fadens in den Circulus Willisii zu einer mikrochirurgischen Herausforderung, wofür man zudem ein speziell ausgestattetes Operationsmikroskop braucht. Ebenso sind die neurologischen Tests bei diesen Tieren nur begrenzt aussagekräftig. Die Mäuse sind von Natur aus mit - im Vergleich zum Menschen - eingeschränkten, auf Instinkten basierenden, intellektuellen Fähigkeiten ausgestattet. Veränderungen im normalen Verhalten lassen sich hier nur mit entsprechender Erfahrung detektieren.

Schließlich haben Mäuse eine kurze Lebensspanne von nur ca. zwei Jahren. Dies lässt sie relativ schnell altern und der Faktor Alter kann somit verhältnismäßig einfach untersucht werden.

Hinsichtlich der Genetik stimmt das Mausgenom zu 92% mit dem menschlichen Genom überein (134), was durchaus als eine sehr hohe Übereinstimmungsquote gesehen werden

kann. Im Vergleich dazu erreicht das Schimpansengenom eine Übereinstimmung von 98,5% (135).

Alles in allem stellen Mäuse ein kostengünstiges und praktikables Tiermodell dar, das im Vergleich zu höher entwickelten Spezies wie Primaten eine größere Gruppentierzahl und schnellere Versuchsdurchführung erlaubt, weswegen sich die Maus als Modell-Organismus insbesondere für die Grundlagenforschung bestens eignet.

Tamoxifen-induzierbares konditionales Gpx4-Knockout-Modell

Die Gpx4 wurde in dieser Arbeit gezielt und terminiert im Endothel der Tiere deletiert. Da Mäuse mit einem globalen Gpx4 Knockout bereits embryonal versterben (94) und auch konstitutive endothelspezifische Gpx4 Knockout-Mäuse embryonal letal sind (unpublizierte Daten), war es notwendig, ein induzierbares konditionales Tamoxifen-induziertes Knockout-Mausmodell zu verwenden. Der Wirkstoff Tamoxifen wird in der Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Wirkstoffen zur Krebsbehandlung hat Tamoxifen ein übersichtliches Nebenwirkungspotenzial, weist aber eine gewisse Toxizität auf (136). Auch für die Aktivierung des Rekombinase-Enzyms CRE wurden negative Effekte wie Wachstumshemmung und DNA-Schädigung publiziert (137, 138). Um die Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch diese unerwünschten Nebeneffekte auszuschließen, wurden alle Versuchstiere, Knockout- als auch Wildtyp-Kontrolltiere mit derselben Tamoxifen-Konzentration behandelt. Zusätzlich wurden die Tiere frühestens 3 Wochen nach Tamoxifen-Induktion in den Versuch genommen, um sicherzustellen, dass das Tamoxifen zwischenzeitlich aus dem Organismus eliminiert wurde (139).

Fütterung mit Vitamin E-Mangeldiät

Die Vitamin E-Konzentration der verwendeten Vitamin-E-Mangeldiät betrug 7 mg/kg, während in der normalen Standard-Diät die Vitamin E-Konzentration 120 mg/kg beträgt. Die Tiere aus der Versuchsgruppe 3, die mit Vitamin E-Mangel-Diät gefüttert wurden, bekamen also nur ca. 6% der Vitamin E-Menge, die die Tiere unter Standard-Diät bekommen haben. Die Vitamin E-Mangel-Diät wurde in dieser Arbeit über einen begrenzten Zeitraum von 3-5 Wochen verabreicht, wohingegen in anderen Studien, die ebenso diese Diät verwendeten, einen wesentlich längeren Zeitraum (über mehrere Monate) für die Fütterung der Mangel-Diät gewählt wurde (117, 140). Durch eine verlängerte Fütterung der Vitamin E-Mangel-Diät wäre es sicher möglich, einen ausgeprägteren Phänotyp zu erhalten. Die kurze Fütterungsperiode war allerdings auf Grund des aktuellen experimentellen Designs notwendig und gewollt, d.h.

SAB sollte bei jungen, sechs bis acht Wochen alten Tieren durchzuführen werden. Nur durch diese Vorgehensweise war es möglich, die Ergebnisse dieser Gruppe mit der Versuchsgruppe 1 vergleichen zu können, die dasselbe Alter von sechs bis acht Wochen hatte, aber mit Standard-Diät gefüttert wurde.

Technisch ist es außerdem herausfordernd, Vitamin E komplett aus dem Futter zu extrahieren, da es in erster Linie in Getreide vorkommt, die den Hauptbestandteil der Nager-Diät ausmachen. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass durch einen länger andauernden Vitamin E-Entzug ein deutlicherer Effekt auf das Outcome nach SAB hätte erzielt werden können.

Vitamin E wurde den Mäusen außerdem erst nach dem Absetzen gefüttert, d.h. vorher konnten die Tiere dieses Vitamin über die Muttermilch aufnehmen. Nachdem Vitamin E ein fettlösliches Vitamin ist, wurde es auch teilweise im Fettgewebe gespeichert und diente unter Vitamin E-Mangel-Ernährung anfangs als Reserve. Die Vitamin-E-Spiegel im Blut der Mäuse wurden vor SAB auf Grund ausreichender Datenlage in der Literatur nicht bestimmt (140, 141).

Studien belegen, dass bei Verlust eines antioxidativen Enzyms des zellulären Schutzsystems gegen oxidativen Stress bzw. freie Radikale andere Enzyme/Mechanismen hochreguliert werden, um diesen Verlust kompensieren zu können (142). In unserem Fall wurde das antioxidative System an zwei verschiedenen Stellen geschwächt (Gpx4-Deletion und Vitamin E-Mangel), so dass man davon ausgehen kann, dass ausreichend freie Radikale und oxidativer Stress erzeugt wurden. Denkbar ist auch, dass andere im Futter enthaltene, fettlösliche, antioxidativ wirkende Vitamine wie Vitamin D, K oder A teilweise die Funktionen des Vitamin E übernehmen können.

SAB-Induktionsmodell

Beim Modell für die experimentelle Induktion der SAB entschieden wir uns für das intraluminale Fadenperforations-Modell (127, 128). Dieses Modell zeigte sich als besonders vorteilhaft im Vergleich zu anderen SAB-Modellen, wie beispielsweise die Injektion vom autologen Blut in die Cisterna Magna (143) oder die Perforation der intracisternalen Vene (144). Denn ergänzend zum Blutübertritt in den Subarachnoidalraum wird in unserem Modell eine Gefäßruptur gesetzt, die zu einer temporären intrakraniellen Hypertension führt. Diese spielt für das schlechte Outcome nach SAB eine große Rolle. Weitere Vorteile dieses Perforations-Modells ist die klinisch relevante Mortalität der Versuchstiere von ca. 30% (2, 128). Das Cisternen-Blutinjektionsmodell hat hingegen nur eine Mortalität von ca. 3% (143).

Zwar erfordert die Fadenperforationsmethode bis zur sicheren Beherrschung eine Einlernungszeit von etwa drei bis sechs Monaten und großes manuelles Geschick (145, 146), doch modelliert kein anderes SAB Modell eine reale SAB so gut wie dieses Methode (127, 128).

Narkose und Operation

Ebenso wie beim Menschen zeigen Medikamente zur Narkoseaufrechterhaltung und Schmerzbekämpfung auch bei Mäusen mögliche Nebenwirkungen wie Hypotonie, Atemdepression sowie Veränderungen in der zerebrovaskulären Aktivität.

Grundsätzlich stehen zwei Möglichkeiten der Narkotisierung der Mäuse zur Verfügung – die volatile und die injektive. Zur Ersteren gehört beispielsweise das häufig in der Tiermedizin verwendete Inhalationsnarkotikum Isofluran. Dieses wirkt allerdings vasodilatativ (147) und zudem neuroprotektiv (148). Die Injektionsnarkose aus Medetomidin, Fentanyl und Midazolam, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, wirkt sich dagegen kaum auf die zerebrale Mikrozirkulation aus. Auch hält diese Narkose den Blutdruck auf einem physiologischen Niveau, so dass nach SAB, ähnlich wie beim Menschen, eine hohe Nachblutungsrate auftritt (149). Im Vergleich zu anderen Injektionsanästhetika wie Propofol oder Ketamin sind bei dieser Triple-Kombination die hämodynamischen Schwankungen vergleichsweise gering (149).

Fentanyl, ein Opiat, ist allerdings für seine atemdepressive Wirkung bekannt. Um die Atmung dennoch sicher aufrechtzuerhalten, wurden alle in dieser Studie verwendeten Tiere intubiert und maschinell beatmet (150).

Große Hautschnitte am Kopf und am Hals sowie aufwändige Gewebepräparation bieten selbst beim sterilen Arbeiten mögliche Inflammationsquellen. Darüberhinaus stellt das Bohren eines Schädellochs über der Dura mater eine gravierende Verletzung der Schädelintegrität dar. Weiter sind Befestigen der LDF-Sonde mit einem Sekundenkleber und seine postoperative Entfernung eine zusätzliche mechanische Reizung.

Die ICP-Messsonde hat zwar nur in etwa die Größe eines Reiskorns, dennoch wurde sie für den Gebrauch am Menschen konzipiert. Der menschliche Kopf weist aber ca. das 1500-fache Volumen des murinen Schädels auf. Somit stellt solch eine Sonde eine unverhältnismäßig große Volumen- und Druckbelastung für den Mäusekopf dar. Alles in allem stellt die SAB-Operation für die Maus zwar eine große Belastung dar, SHAM-operierte SAB-Mäuse aus anderen Studien unseres Labors zeigten allerdings eine gute, fast 100%ige Genesungs- und Überlebensrate (128).

Beurteilung des Outcomes

Wie bereits angemerkt, ist die Beurteilung des Outcomes nach SAB-Induktion bei Mäusen nicht in dem Ausmaß möglich, wie das beim Menschen der Fall ist. Während bei SAB-Patienten Kriterien wie Rückkehr an den Arbeitsplatz sowie Stimmungslage und Gedächtnis ausschlaggebend für ein positives Outcome sind (151), sind diese Parameter bei Mäusen naturgemäß nicht erhebbar.

Das Hauptkriterium des Outcomes bei Menschen wie bei Tieren ist aber nach wie vor die Überlebensrate und diese lässt sich auch im Tiermodell zuverlässig überprüfen.

4.2 Ergebnisse

Intraoperatives Monitoring

Die Hypothese zu Beginn dieser Arbeit war, dass zerebrale Gefäße mit einem erhöhten Level an oxidativem Stress im Endothel in den zu untersuchenden endothelialen Gpx4-Knockout-Mäusen eine größere Dysfunktionalität aufweisen, als das funktionell intakte Endothel der Wildtyp-Mäuse. Somit war zu erwarten, dass die SAB und das postoperative Outcome nach SAB bei endothelialen Gpx4 Knockout-Mäusen deutlich schlechter als bei Wildtyp-Tieren ausfällt. In Detail würde dies bedeuten, dass der ICP-Wert höher steigt, der rCBF-Wert tiefer fällt, dass mehr Neuronen in den Hippocampus-Regionen untergehen, und sich ein ausgeprägter Hydrozephalus entwickelt. Weiter hätte man schlechtere Ergebnisse bei den postoperativen neurologischen Tests oder eine höhere Mortalität erwartet. Gerade der verspätet einsetzende Vasospasmus mit darauffolgender Ischämie - eine der gefährlichsten Komplikationen nach SAB - wird mit erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht.

Andererseits wäre es auch denkbar, dass die vermehrte Oxidation mit erhöhter Menge an freien Radikalen das postoperativ neurovaskuläre Remodelling anregt (152). Dies hätte einen positiven Effekt auf das Gpx4-defiziente Endothel, sowie die oben aufgeführten Parameter.

Keine dieser Annahmen konnte in unseren Ergebnissen bestätigt werden. Es konnten in keiner der drei Versuchsgruppen signifikante Unterschiede in den oben erwähnten Parametern zwischen den Gpx4 Knockout- und den Wildtyp-Tieren detektiert werden.

Einzig beim Körpergewicht zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen 1 und 3. Doch auch dieses Ergebnis ist kritisch zu betrachten, da nur Mäuse in die Analysen einbezogen wurden, die die 7 postoperativen Tage nach SAB überlebten. Die Tiere, die sich nicht oder nur gering von den Folgen der SAB erholten, mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden und wurden somit nicht in die statistische Analyse miteinbezogen. Somit wurden Tiere, die schlechte Neuroscores, weniger Gewicht, mehr Hydrozephalus und mehr Schädigung der weißen Substanz zeigten, nicht in die Analysen

aufgenommen. Dies hat zu einer Verschiebung der Daten zugunsten der überlebenden Mäuse, die sich besser und schneller von der SAB erholten, geführt. Hätte man alle Mäuse in die Analyse einbezogen, auch die, die 7 postoperativen Tage nach SAB nicht überlebten, hätten sich möglicherweise mehr signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen ergeben. Dies hätte man möglicherweise mit einem kürzeren postoperativen Versuchszeitraum von etwa drei Tagen erreicht.

Anders verhielten sich die Ergebnisse, wenn man die unterschiedlichen Versuchsgruppen, die verschiedenen Versuchsbedingungen ausgesetzt wurden, miteinander verglich.

Ergebnisse der Versuchsgruppe 1

Das intraoperative Monitoring fand über einen limitierten Zeitraum nach der Operation statt (bis 15-20 Minuten nach SAB-Induktion), so dass nicht alle Nachblutungen, die später außerhalb dieses Zeitraums auftraten, erfasst werden konnten. Die kurze OP-Dauer reduzierte aber die mit Narkose verbundenen Risiken und Nebenwirkungen erheblich. Die jüngeren Tiere (Alter 6-8 Wochen, Standard-Diät) der ersten Versuchsgruppe zeigten schon sehr kurz nach der SAB eine gute subjektive und objektive Fitness, die im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen positiv auffiel.

Dieser gute körperliche Allgemeinzustand spiegelte sich auch in der hohen Überlebensrate wieder. Zwar zeigten diese Tiere u.a. auf Grund der relativ kleinen Tierzahl nicht immer statistisch signifikante Unterschiede, doch rein objektiv stand das ausgezeichnete postoperative Outcome dieser Versuchsgruppe in einem starken Kontrast zu den anderen beiden Versuchsgruppen. Die fast 100%ige Überlebensrate hobte sich zudem deutlich von der sonst üblichen Überlebensrate von 60-70% bei diesem SAB-Induktionsmodell ab (128).

Ergebnisse der Versuchsgruppe 2 (und 1)

Tiere in Versuchsgruppe 2 (sechs bis acht Monate alte Tiere) waren zwar deutlich älter als die in Versuchsgruppen 1 und 3 (sechs bis acht Wochen), doch ist es bei Mäusen relativ schwer zu definieren, wann das „Altern“ in unserem Sinne eintritt. Anders als bei vielen SAB-Patienten waren sie nicht über lange Zeit unausgewogener Ernährung, Zigarettenrauchen oder arterieller Hypertonie ausgesetzt. Ihre Ausgangssituation unterscheidet sich also diesbezüglich wesentlich, weswegen die chronische Akkumulation oxidativer Reaktionsprodukte bzw. der oxidative Stress wahrscheinlich deutlicher niedriger liegt, als beim Menschen im hohen Alter. Auffällig war bei diesen Tieren, dass sie durch das höhere Alter und das längere Leben in

Käfigen mit eingeschränkten Bewegungsmöglichkeiten bei ausreichend Futter deutlich mehr wogen als die jüngeren Tiere der beiden anderen Versuchsgruppen. Dies spiegelte sich in einem statistisch signifikanten Unterschied im Gewicht im Vergleich zur Versuchsgruppe 1 wieder. Auch zeigten die älteren Tiere ein signifikant höheres neurologisches Defizit, was sich so auch bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren nach einer SAB beobachten lässt (153).

Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 (und 1)

Die Versuchsgruppe 3 zeigte in den drei analysierten Parametern des postoperativen Outcomes signifikante Unterschiede zur ersten Versuchsgruppe. Unser Augenmerk fiel dabei auf das deutlichste der drei Kriterien – das postoperative Überleben bei den Vitamin E-gemangelten Knockout-Tieren (Versuchsgruppe 3) im Vergleich zu den mit Standard-Diät gefütterten Knockout-Tieren (Versuchsgruppe 1). Wie schon beschrieben (117), zeigten endothelspezifische Gpx4 Knockout-Mäuse ohne zusätzlichen Stress keinen offensichtlichen Phänotyp. Ein zusätzlicher Mangel an Vitamin E, bis dato der wichtigste Synergist der Gpx4, scheint allerdings vom Organismus nur schwer zu kompensieren zu sein, was sich in einem signifikant schlechteren Outcome und einer erhöhten Mortalitätsrate nach SAB äußerte.

Es ist also durchaus anzunehmen, dass Gpx4 eine entscheidende Rolle bei der antioxidativen Abwehr nach einer SAB spielt, und diese zumindest teilweise von Vitamin E übernommen werden kann.

SAB, Early Brain Injury und Vasospasmus

Obwohl das Verständnis der Pathologie des Vasospasmus nach SAB fortgeschritten ist, wurde dieses Wissen bis dato in keine klinisch relevante Behandlung umgewandelt (64). Zum einen liegt es an der Tatsache, dass Tiere nicht die gleichen gesundheitlichen Ausgangsbedingungen wie Patienten haben. Weiter spielt zwar der oxidative Stress nach dem heutigen Stand der Wissenschaft mit Sicherheit eine der wichtigsten, aber dennoch nicht die einzige Rolle bei der Entstehung des Vasospasmus nach SAB (67). So konnte beispielsweise in bisherigen Untersuchungen mit SAB-Patienten gezeigt werden, dass die Aktivität der Gpx1, einer ebenfalls bedeutenden seleniumhaltigen Peroxidase, in Liquor von SAB-Patienten mit Vasospasmus signifikant erhöht war, (44), die Menge an Gpx1-Protein war dabei allerdings in beiden Fällen gleich. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass ein erhöhter oxidativer Stress mit der Entstehung eines Vasospasmus nach SAB in Zusammenhang steht. Unklar dabei ist allerdings, ob der erhöhte oxidative Stress, der sich in der erhöhten Aktivität der Gpx

zum Ausdruck kommt, zu einem Vasospasmus nach SAB führt, oder ob es in Folge des Vasospasmus zu einer erhöhten ROS-Produktion und somit zu einer gesteigerten antioxidativen Antwort mit erhöhter Gpx-Aktivität kommt (64).

Außerdem müssten alle in Frage kommenden Antioxidantien eine entsprechende biologische Verfügbarkeit aufweisen und die Blut-Hirn-Schranke passieren können, um am Ort des Geschehens, im Gehirn, wirksam zu sein.

Das erklärt womöglich, warum sich bis jetzt keine einzige antioxidative Therapie als ausreichend wirksam erwies.

Übertragung der Ergebnisse in die Praxis

Trotz der Tatsache, dass Vitamin E in vielen Lebensmitteln, insbesondere im Getreide vorkommt, leiden ca. 90% der US-Amerikaner an Vitamin-E-Mangel (154). Interessant wäre es allerdings zu untersuchen, ob eine vorsorgliche zusätzliche Einnahme von Vitamin E bei Patienten, die im Hinblick auf eine SAB besonders gefährdet sind, zu einem besseren Outcome nach einer aufgetretenen SAB führen würde. Zu solchen Patienten würden beispielsweise hypertone Raucher mit bereits vorhandenen intrakraniellen Aneurysmen zählen, oder Patienten, die bereits eine SAB erlitten hatten.

Eine präventive Vitamin E-Einnahme bei SAB-Risikopatienten sollte nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft allerdings nicht erfolgen (155). Bei der jetzigen Studienlage zeigt sich nämlich, dass eine regelmäßige Einnahme von mindestens 400 I.E. Vitamin E u.a. sogar die Mortalitätsrate erhöhen kann (156).

Wurde Vitamin E allerdings präventiv vor SAB-Induktion bei Mäusen in die Cisterna Magna injiziert, führte dies zu einer signifikanten Reduktion der postoperativen Vasospasmen (157).

Diese Arbeit wirft somit weitere wissenschaftliche Fragen auf, wie beispielsweise, ob nicht bestimmte Antioxidantien, rechtzeitig und zielgerichtet eingesetzt, bei Tieren wie beim Menschen das Outcome nach einer SAB doch verbessern könnten.

Weiter könnte außerdem untersucht werden, welche Rolle die Gpx4 in anderen Geweben des Gehirns wie beispielsweise in Neuronen, Astrozyten oder Mikrogliazellen spielt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Rolle der Glutathionperoxidase 4 bei der Subarachnoidalblutung am Mausmodell

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist eine Unterform des hämorrhagischen Schlaganfalls, die vergleichsweise junge Menschen betrifft. Teilweise gefährlicher als die SAB selbst sind ihre Komplikationen. Zu den wichtigsten gehören Nachblutung, early brain injury und zerebraler Vasospasmus. Als zentrale Ursache für den Vasospasmus gilt der nach einer SAB entstandene oxidative Stress. Zu der primären antioxidativen Antwort des Körpers gehört die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) und das Vitamin E.

Um das Zusammenwirken von Gpx4, Vitamin E und Alter nach einer SAB zu erforschen, benutzten wir ein Knock-Out-Mausmodell, bei dem die Gpx4 mit Hilfe des Cre-lox Systems ausschließlich in Endothelzellen ausgeschaltet wurde.

Diese Tiere und entsprechende Kontrollen wurden einer SAB ausgesetzt. In einem zweiten Versuch wurde die SAB an alten Knockout Mäusen und an Tieren mit Vitamin E Mangel durchgeführt. Während sich innerhalb der einzelnen Gruppen praktisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren zeigten, haben wir signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt. Am auffälligsten waren dabei die Unterschiede bezüglich Neuroscores, Gewicht und Mortalität. Sowohl zwischen den *jungen normalernährten* und den *alten normalernährten* Tieren als auch zwischen den *jungen normalernährten* und *jungen Vitamin-E-gemangelten Tieren* zeigten sich Unterschiede im postoperativen Resultat. Allem voran fiel dabei der massive Unterschied der **postoperativen Mortalität** auf. Es konnte in dieser Arbeit folglich gezeigt werden, dass **Vitamin-E-Mangel** das Outcome nach einer SAB dramatisch verschlechtert.

6 Summary and Outlook

Role of glutathione peroxidase 4 in subarachnoid hemorrhage on the mouse model

SAH is a subtype of hemorrhagic stroke which affects mainly younger people. Partially even more dangerous than the SAH itself are its complications. The most important ones include rebleeding, early brain injury and cerebral vasospasm with subsequent cerebral ischemia. One of the central causes of vasospasm is oxidative stress. The body's primary antioxidant response involves Gpx4 and vitamin E.

To explore the interaction of Gpx4, vitamin E, and age after SAH, we used a knock-out mouse model in which Gpx4 was knocked out exclusively in the endothelial cells by using the Cre-lox system.

At the beginning these animals and their controls were only exposed to SAH. Thereafter, their physiological and histological parameters were evaluated. In the second part of the study, the same knock out mouse model was used in aged, and in a vitamin E deficient animals. While there were practically no significant differences between the knock out and wild type animals within the individual groups, significant differences were found between the three experimental groups. Most notable were the contrasts in postoperative outcome after SAB, as measured by neuroscores, weight and mortality. There were differences in the postoperative outcome as well between the *young normal-nourished* and *the old normal-nourished* animals as between the *young normal-nourished* and *young vitamin E-deficient* mice. Especially notable was the massive difference in **postoperative mortality**. Consequently, in this thesis it could be shown that **vitamin E deficiency** dramatically negatively affects the outcome and the mortality after SAH.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACA	Arteria cerebri anterior
AF	Atemfrequenz
Aqua.dest.	destilliertes Wasser
BA	Arteria basilaris
Bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
CA	Cornu Ammonis (Hippocampus-Regionen)
CBF	Cerebral Blood Flow
CCA	Arteria Carotis Communis
CEA	Arteria Carotis Externa
CIA	Arteria Carotis Interna
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CONSCIOUS-2	C lazosentan to O vercome N eurological iS chemia and I nfarct O ccUrring after S ubarachnoid hemorrhage – Phase 2
CPA	Arteria cerebri posterior
CRE	Rekombinase; causes recombination/ cyclization recombinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EBI	early brain injury
EC	Endothelial Cell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FELASA	recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units, FELASA working group, Laboratory animals, 2014

fl	gefloxt, eng. floxed = flanked by loxP; dt. ‚von loxP-Stellen flankiert‘
g	Gramm
Gpx4	Glutathionperoxidase 4
Gpx4 ^{iECKO}	inducible Endothelial Cell Glutathione Peroxidase 4 Knock Out
Gpx4 ^{iECWT}	inducible Endothelial Cell Glutathione Peroxidase 4 Wild Type
GSH/GSSH	Gluthation
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
I(i)	Inducible
i.p.	intraperitoneal
IACA	Arteria inferior anterior cerebelli
ICP	Intracranial Pressure
k	kilo (10 ³)
KG	Körpergewicht
KO	Knock-Out
l	Liter
LA	Arteria labyrinthi
LB	Lysisbuffer
LDF	Laser-Doppler-Flowmeter
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (Mol pro Liter)
M.	Musculus
MCA	Arteria cerebri media
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute(n)
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NO	Stickstoffmonoxid
NTP	Ribonukleosid-5´-Triphosphat
OP	Operation
oxyHb	Oxyhämoglobin

P	Wahrscheinlichkeit
p.a.	pro Jahr
PBS	Phosphat-buffered saline
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
pH	potentia hydrogenii
PN	Peroxyinitrit
rCBF	regional Cerebral Blood Flow
ROI	Region of Interest
ROS	reactive oxygen species
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAB	Subarachnoidalblutung
SAH	subarachnoid hemorrhage
s.c.	subcutan
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCA	Arteria superior cerebelli
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE-Puffer	TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan, Ethylendiamintetraacetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VA	Arteria vertebralis
VG	Versuchsgruppe
Vit.E	Vitamin E
vs	versus
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Als allererstes möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Manuela Schneider danken. Sie stand mir all die Jahre unterstützend zur Seite und begleitete mich zuverlässig durch die gesamte Dissertation. Erst dank ihren wissenschaftlichen Vorarbeiten, ihrem Engagement und ihrer fachlichen Kompetenz erblickte diese Arbeit die Welt.

Desweiteren gebührt mein großer Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Nikolaus Plesnila. Seine fachliche Exzellenz sowie menschliche Zugewandtheit machten das Arbeiten angenehm und die Lehre aus meiner Promotion vollkommen.

Der „guten Seele“ unserer Arbeitsgruppe, Farida Hellal, möchte ich an dieser Stelle einen besonderen Dank sowie meine tiefste menschliche Bewunderung zum Ausdruck bringen. Ihre warmherzige, sonnige Art machte mir das Arbeiten am ISD zu einem Vergnügen.

Als Nächstes möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden bedanken. Allen voran danke ich Sascha d’Almeida und Iga Rynarzewska, die nicht nur fachlich gesehen stets ein offenes Ohr für mich hatte, und mich in vielen Angelegenheiten unterstützte, sondern auch privat eine herausragende, hilfsbereite und größte menschliche Wärme ausstrahlende Person ist.

Bedeutende Hilfestellung erfuhr ich zudem von den technischen Assistentinnen Uta Mamrak und Nicole Heumos. Ich möchte mich bei ihnen, sowie bei allen anderen Angestellten des ISD für ihre Hilfe beim Einlernen in komplexe wissenschaftliche Methoden sowie die ständige Unterstützung mit jeder Art von Rat und Tat vom ganzen Herzen bedanken. An dieser Stelle seien noch besonders Kathrin Nehrkorn, Sepiede Azhgandi, Matilde Balbi, Dominik Bühler und Peggy Kunath in meinem Dank erwähnt.

Großen Dank verdient außerdem das Programm „Förderung Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität München. Es ermöglichte mir das lehrreiche Promotionsstudium der Systembiologischen Medizin, im Rahmen dessen auch diese Doktorarbeit entstand.

Dank der Einfühlsamkeit der Frau Dr. Laser konnte ich zum Endspurt dieser Doktorarbeit übergehen, vom Herzen einen großen Dank dafür.

Auch Gabriele trug unendlich viel zu dieser Doktorarbeit bei und keine Hundert Seiten würden reichen, um ihre menschliche Größe sowie meinen tiefsten Dank und meine größte Bewunderung an sie zum Ausdruck zu bringen.

Meinen Großeltern schulde ich einen in der Größe nicht zu übertreffenden Dank. Sie haben mich zutiefst geprägt, indem sie sich intensiv an meiner frühen Erziehung sowie an meinem weiteren Werdegang beteiligt haben. Dabei haben sie mir nicht nur den großen Wert einer guten akademischen Bildung stets nahegelegt, sondern auch immer versucht mir den festen Glauben an das Gute in den Menschen zu vermitteln. An welchem Ort dieses Universums Ihr jetzt auch sein mögt, alle Errungenschaften meines Lebens werden für immer Euch gewidmet sein, denn niemand wird jemals mehr dazu beigetragen haben.

Ich möchte auch ganz besonders meinen Eltern danken. Sie haben mir das Studium ermöglicht, mich stets gefördert und unterstützt. Sie trugen mit ihrer Unterstützung maßgeblich dazu bei, dass ich diese Dissertation zu Ende bringen konnte.

Zum Schluss danke ich meinem engsten Freund, meinem zuverlässigsten Berater und der Liebe meines Lebens in einer Person, meinem wundervollen Ehemann Stephan. Durch Deine liebevolle Fürsorge, Motivation und Hilfestellung ist Dein Beitrag zu dieser Arbeit unermesslich. Ich danke Dir für Deine grenzenlose Liebe, Unterstützung und Geduld. Um Dein großes Herz, all Deine Güte und Deine Einzigartigkeit zu beschreiben, bedarf es einer weiteren Doktorarbeit. Ich danke Dir, dass es Dich gibt.

Zuallerletzt will ich meiner kleinen wunderschönen Tochter Ophelia Sophia danken. Du gabst meinem Leben einen ganz neuen Sinn. Durch Dich erfuhr ich neue Dimensionen an Gefühlen. Du bist das Beste, was mir je passiert ist. Ab Deiner Ankunft in dieser Welt sind alle meine Arbeiten Dir gewidmet und jeder Atemzug ist für Dich. Ich liebe Dich.

9 Literaturverzeichnis

1. Clarke E. Apoplexy in the Hippocratic Writings. *Bull Hist Med.* 1963;37:301-14.
2. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet.* 2007;369(9558):306-18.
3. Truelsen T, Krarup LH, Iversen HK, Mensah GA, Feigin VL, Sposato LA, et al. Causes of Death Data in the Global Burden of Disease Estimates for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Neuroepidemiology.* 2015;45(3):152-60.
4. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Headache characteristics in subarachnoid haemorrhage and benign thunderclap headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;65(5):791-3.
5. Perry JJ, Sivilotti MLA, Sutherland J, Hohl CM, Emond M, Calder LA, et al. Validation of the Ottawa Subarachnoid Hemorrhage Rule in patients with acute headache. *CMAJ.* 2017;189(45):E1379-E85.
6. Schievink WI, Wijdicks EF, Parisi JE, Piepgras DG, Whisnant JP. Sudden death from aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurology.* 1995;45(5):871-4.
7. van Lieshout JH, Fischer I, Kamp MA, Donders ART, Cornelius JF, Steiger HJ, et al. Subarachnoid Hemorrhage in Germany Between 2010 and 2013: Estimated Incidence Rates Based on a Nationwide Hospital Discharge Registry. *World Neurosurg.* 2017;104:516-21.
8. Hughes JD, Bond KM, Mekary RA, Dewan MC, Rattani A, Baticulon R, et al. Estimating the Global Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review for Central Nervous System Vascular Lesions and Meta-Analysis of Ruptured Aneurysms. *World Neurosurg.* 2018.
9. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain.* 2001;124(Pt 2):249-78.
10. Zhang Y, Chapman AM, Plested M, Jackson D, Purroy F. The Incidence, Prevalence, and Mortality of Stroke in France, Germany, Italy, Spain, the UK, and the US: A Literature Review. *Stroke Res Treat.* 2012;2012:436125.
11. Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke.* 2015;46(5):e121-2.
12. Schweizer TA, Macdonald RL. Brain hemorrhage: assessing outcome after subarachnoid hemorrhage. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(8):427-8.
13. Kirkpatrick PJ. Subarachnoid haemorrhage and intracranial aneurysms: what neurologists need to know. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73 Suppl 1:i28-33.
14. Kataoka H. Molecular mechanisms of the formation and progression of intracranial aneurysms. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2015;55(3):214-29.
15. Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(13):226-36.
16. Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke.* 2005;36(12):2773-80.
17. Andreassen TH, Bartek J, Jr., Andresen M, Springborg JB, Romner B. Modifiable risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2013;44(12):3607-12.
18. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med.* 1992;326(11):733-6.
19. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FH, de Rooij NK, Rinkel GJ. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2009;8(7):635-42.
20. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke.* 1996;27(4):625-9.
21. Labovitz DL, Halim AX, Brent B, Boden-Albala B, Hauser WA, Sacco RL. Subarachnoid hemorrhage incidence among Whites, Blacks and Caribbean Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Neuroepidemiology.* 2006;26(3):147-50.

-
22. Rumalla K, Smith KA, Arnold PM, Mittal MK. Subarachnoid Hemorrhage and Readmissions: National Rates, Causes, Risk Factors, and Outcomes in 16,001 Hospitalized Patients. *World Neurosurg.* 2018;110:e100-e11.
 23. Ekman M. Economic evidence in stroke: a review. *Eur J Health Econ.* 2004;5 Suppl 1:S74-83.
 24. Rivero-Arias O, Gray A, Wolstenholme J. Burden of disease and costs of aneurysmal subarachnoid haemorrhage (aSAH) in the United Kingdom. *Cost Eff Resour Alloc.* 2010;8:6.
 25. Zacharia BE, Hickman ZL, Grobelny BT, DeRosa P, Kotchetkov I, Ducruet AF, et al. Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am.* 2010;21(2):221-33.
 26. Rodholm M, Starmark JE, Ekholm S, von Essen C. Organic psychiatric disorders after aneurysmal SAH: outcome and associations with age, bleeding severity, and arterial hypertension. *Acta Neurol Scand.* 2002;106(1):8-18.
 27. Johnston SC, Selvin S, Gress DR. The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology.* 1998;50(5):1413-8.
 28. Dodel R, Winter Y, Ringel F, Spottke A, Gharevi N, Muller I, et al. Cost of illness in subarachnoid hemorrhage: a German longitudinal study. *Stroke.* 2010;41(12):2918-23.
 29. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke.* 2006;37(5):1179-83.
 30. Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke.* 1996;27(9):1459-66.
 31. Joo H, George MG, Fang J, Wang G. A literature review of indirect costs associated with stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014;23(7):1753-63.
 32. Kolominsky-Rabas PL, Wiedmann S, Weingartner M, Liman TG, Endres M, Schwab S, et al. Time trends in incidence of pathological and etiological stroke subtypes during 16 years: the Erlangen Stroke Project. *Neuroepidemiology.* 2015;44(1):24-9.
 33. Gloede TD, Halbach SM, Thrift AG, Dewey HM, Pfaff H, Cadilhac DA. Long-term costs of stroke using 10-year longitudinal data from the North East Melbourne Stroke Incidence Study. *Stroke.* 2014;45(11):3389-94.
 34. Larsen CC, Astrup J. Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a literature review. *World Neurosurg.* 2013;79(2):307-12.
 35. Pasqualin A. Epidemiology and pathophysiology of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci.* 1998;42(1 Suppl 1):15-21.
 36. Darsaut TE, Jack AS, Kerr RS, Raymond J. International Subarachnoid Aneurysm Trial - ISAT part II: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2013;14:156.
 37. Kamensky J. Neurosurgical versus endovascular treatment of subarachnoid haemorrhage caused by ruptured cerebral aneurysm: comparison of patient outcomes. *J Perioper Pract.* 2015;25(3):53-7.
 38. Etminan N, Macdonald RL. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Handb Clin Neurol.* 2017;140:195-228.
 39. Grasso G, Alafaci C, Macdonald RL. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: State of the art and future perspectives. *Surg Neurol Int.* 2017;8:11.
 40. Suzuki H, Kanamaru K, Kuroki M, Sun H, Waga S, Miyazawa T. Effects of tirilazad mesylate on vasospasm and phospholipid hydroperoxides in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1999;30(2):450-5; discussion 5-6.
 41. Handa Y, Kaneko M, Takeuchi H, Tsuchida A, Kobayashi H, Kubota T. Effect of an antioxidant, ebselen, on development of chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. *Surg Neurol.* 2000;53(4):323-9.
 42. Saito I, Asano T, Sano K, Takakura K, Abe H, Yoshimoto T, et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1998;42(2):269-77; discussion 77-8.
 43. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, Shaw MD, Teasdale GM, Foy PM, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ.* 1989;298(6674):636-42.
 44. Pyne-Geithman GJ, Caudell DN, Prakash P, Clark JF. Glutathione peroxidase and subarachnoid hemorrhage: implications for the role of oxidative stress in cerebral vasospasm. *Neurol Res.* 2009;31(2):195-9.
-

-
45. Macdonald RL, Schweizer TA. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2017;389(10069):655-66.
 46. Francoeur CL, Mayer SA. Management of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care*. 2016;20(1):277.
 47. Brilstra EH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Rebleeding, secondary ischemia, and timing of operation in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2000;55(11):1656-60.
 48. Plesnila N. Pathophysiological Role of Global Cerebral Ischemia following Subarachnoid Hemorrhage: The Current Experimental Evidence. *Stroke Res Treat*. 2013;2013:651958.
 49. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, et al. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol*. 2011;10(7):618-25.
 50. Millikan CH. Cerebral vasospasm and ruptured intracranial aneurysm. *Arch Neurol*. 1975;32(7):433-49.
 51. Terpolilli NA, Brem C, Buhler D, Plesnila N. Are We Barking Up the Wrong Vessels? Cerebral Microcirculation After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2015;46(10):3014-9.
 52. Sehba FA, Bederson JB. Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*. 2006;28(4):381-98.
 53. Harrod CG, Bendok BR, Batjer HH. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review. *Neurosurgery*. 2005;56(4):633-54; discussion -54.
 54. Weir B, Grace M, Hansen J, Rothberg C. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg*. 1978;48(2):173-8.
 55. Pobereskin LH. Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70(3):340-3.
 56. Honda M, Sase S, Yokota K, Ichibayashi R, Yoshihara K, Sakata Y, et al. Early cerebral circulatory disturbance in patients suffering subarachnoid hemorrhage prior to the delayed cerebral vasospasm stage: xenon computed tomography and perfusion computed tomography study. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(7):488-94.
 57. Uhl E, Lehmberg J, Steiger HJ, Messmer K. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery*. 2003;52(6):1307-15; discussion 15-7.
 58. Pennings FA, Bouma GJ, Ince C. Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility. *Stroke*. 2004;35(6):1284-8.
 59. Sun BL, Zheng CB, Yang MF, Yuan H, Zhang SM, Wang LX. Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(2):235-41.
 60. Friedrich B, Muller F, Feiler S, Scholler K, Plesnila N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(3):447-55.
 61. Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? *Stroke*. 2009;40(3 Suppl):S86-7.
 62. Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(8):916-25.
 63. Topkuru B, Egemen E, Solaroglu I, Zhang JH. Early Brain Injury or Vasospasm? An Overview of Common Mechanisms. *Curr Drug Targets*. 2017;18(12):1424-9.
 64. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res*. 2009;31(2):151-8.
 65. Caner B, Hou J, Altay O, Fujii M, Zhang JH. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem*. 2012;123 Suppl 2:12-21.
 66. Fujii M, Yan J, Rolland WB, Soejima Y, Caner B, Zhang JH. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res*. 2013;4(4):432-46.
 67. Ciurea AV, Palade C, Voinescu D, Nica DA. Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm - literature review. *J Med Life*. 2013;6(2):120-5.
 68. Terpolilli NA, Feiler S, Dienel A, Muller F, Heumos N, Friedrich B, et al. Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(12):2096-107.
-

-
69. Schwarzmaier SM, Terpolilli NA, Dienel A, Gallozzi M, Schinzel R, Tegtmeier F, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2015;32(10):731-8.
 70. Terpolilli NA, Kim SW, Thal SC, Kataoka H, Zeisig V, Nitzsche B, et al. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circ Res*. 2012;110(5):727-38.
 71. Sabri M, Ai J, Macdonald RL. Nitric oxide related pathophysiological changes following subarachnoid haemorrhage. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2011;110(Pt 1):105-9.
 72. Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(10):1223-33.
 73. Kranc KR, Pyne GJ, Tao L, Claridge TD, Harris DA, Cadoux-Hudson TA, et al. Oxidative degradation of bilirubin produces vasoactive compounds. *Eur J Biochem*. 2000;267(24):7094-101.
 74. Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez y Baena R, Borasio E, Marzatico F. Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1998;89(5):748-54.
 75. Macdonald RL, Weir BK. Cerebral vasospasm and free radicals. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(5):633-43.
 76. Sakaki S, Ohta S, Nakamura H, Takeda S. Free radical reaction and biological defense mechanism in the pathogenesis of prolonged vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988;8(1):1-8.
 77. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89-96.
 78. Sano K, Asano T, Tanishima T, Sasaki T. Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res*. 1980;2(3-4):253-72.
 79. Kamezaki T, Yanaka K, Nagase S, Fujita K, Kato N, Nose T. Increased levels of lipid peroxides as predictive of symptomatic vasospasm and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2002;97(6):1302-5.
 80. Jorgensen A, Staalsoe JM, Simonsen AH, Hasselbalch SG, Høgh P, Weimann A, et al. Progressive DNA and RNA damage from oxidation after aneurysmal subarachnoid haemorrhage in humans. *Free Radic Res*. 2018;52(1):51-6.
 81. Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, Altay O, Zhang JH. Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2011;110(Pt 1):43-8.
 82. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1065-96.
 83. Yang Y, Chen S, Zhang JM. The Updated Role of Oxidative Stress in Subarachnoid Hemorrhage. *Curr Drug Deliv*. 2017;14(6):832-42.
 84. Ayer RE, Zhang JH. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2008;104:33-41.
 85. Marzatico F, Gaetani P, Cafe C, Spanu G, Rodriguez y Baena R. Antioxidant enzymatic activities after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurol Scand*. 1993;87(1):62-6.
 86. Gaetani P, Lombardi D. Brain damage following subarachnoid hemorrhage: the imbalance between antioxidant systems and lipid peroxidative processes. *J Neurosurg Sci*. 1992;36(1):1-10.
 87. Macdonald RL, Weir BK, Runzer TD, Grace MG. Malondialdehyde, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in cerebrospinal fluid during cerebral vasospasm in monkeys. *Can J Neurol Sci*. 1992;19(3):326-32.
 88. McGirt MJ, Parra A, Sheng H, Higuchi Y, Oury TD, Laskowitz DT, et al. Attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Stroke*. 2002;33(9):2317-23.
 89. Watanabe T, Sasaki T, Asano T, Takakura K, Sano K, Fuchinoue T, et al. Changes in glutathione peroxidase and lipid peroxides in cerebrospinal fluid and serum after subarachnoid hemorrhage--with special reference to the occurrence of cerebral vasospasm. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1988;28(7):645-9.
 90. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*. 2008;8(3):237-48.
-

-
91. Froehler MT, Kooshkabadi A, Miller-Lotan R, Blum S, Sher S, Levy A, et al. Vasospasm after subarachnoid hemorrhage in haptoglobin 2-2 mice can be prevented with a glutathione peroxidase mimetic. *J Clin Neurosci*. 2010;17(9):1169-72.
 92. Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biol Chem*. 2007;388(10):1019-25.
 93. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React*. 1986;8(2):99-103.
 94. Schneider M, Vogt Weisenhorn DM, Seiler A, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M. Embryonic expression profile of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene Expr Patterns*. 2006;6(5):489-94.
 95. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, et al. The selenoprotein GPx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(4):496-502.
 96. Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, et al. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1820-7.
 97. Savaskan NE, Ufer C, Kuhn H, Borchert A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem*. 2007;388(10):1007-17.
 98. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*. 2006;387(10-11):1329-35.
 99. Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*. 2009;23(9):3233-42.
 100. Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki J, Suzuki T, Tajima Y, et al. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32522-32.
 101. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*. 1982;710(2):197-211.
 102. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids*. 1987;44(2-4):255-76.
 103. Sneddon AA, Wu HC, Farquharson A, Grant I, Arthur JR, Rotondo D, et al. Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*. 2003;171(1):57-65.
 104. Zalba G, Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Belouqui O, Diez J. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24 Suppl 1:24-9.
 105. Sakai O, Yasuzawa T, Sumikawa Y, Ueta T, Imai H, Sawabe A, et al. Role of GPx4 in human vascular endothelial cells, and the compensatory activity of brown rice on GPx4 ablation condition. *Pathophysiology*. 2017;24(1):9-15.
 106. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, et al. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(4):715-24.
 107. Chen LH, Thacker RR. Vitamin C partially reversed some biochemical changes produced by vitamin E deficiency. *Biotechnol Appl Biochem*. 1986;8(1):40-5.
 108. Maiorino M, Coassin M, Roveri A, Ursini F. Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids*. 1989;24(8):721-6.
 109. Wu JH, Croft KD. Vitamin E metabolism. *Mol Aspects Med*. 2007;28(5-6):437-52.
 110. Niki E, Traber MG. A history of vitamin E. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(3):207-12.
 111. Paynter DI. The role of dietary copper, manganese, selenium, and vitamin E in lipid peroxidation in tissues of the rat. *Biol Trace Elem Res*. 1980;2(2):121-35.
 112. Tappel AL. Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;355:18-31.
 113. Stevanovic D, Zhang D, Blumenstein A, Djuric D, Heinle H. Effects of hydroperoxides on contractile reactivity and free radical production of porcine brain arteries. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28 Spec No:93-7.
 114. Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, Biasi F, Poli G. Inflammation-related gene expression by lipid oxidation-derived products in the progression of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):19-34.
 115. Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG, et al. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes Dev*. 2018;32(9-10):602-19.
-

-
116. Schneider M, Wortmann M, Mandal PK, Arpornchayanon W, Jannasch K, Alves F, et al. Absence of glutathione peroxidase 4 affects tumor angiogenesis through increased 12/15-lipoxygenase activity. *Neoplasia*. 2010;12(3):254-63.
 117. Wortmann M, Schneider M, Pircher J, Hellfritsch J, Aichler M, Vegi N, et al. Combined deficiency in glutathione peroxidase 4 and vitamin E causes multiorgan thrombus formation and early death in mice. *Circ Res*. 2013;113(4):408-17.
 118. Imai H. [Biological significance of lipid hydroperoxide and its reducing enzyme, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in mammalian cells]. *Yakugaku Zasshi*. 2004;124(12):937-57.
 119. Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem*. 1984;259(3):1509-14.
 120. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*. 1981;150(4):467-86.
 121. Hoess R, Wierzbicki A, Abremski K. Formation of small circular DNA molecules via an in vitro site-specific recombination system. *Gene*. 1985;40(2-3):325-9.
 122. Hoess R, Abremski K, Sternberg N. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1984;49:761-8.
 123. Hoess RH, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(4):1026-9.
 124. Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc*. 2010;5(9):1518-34.
 125. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):752-7.
 126. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1995;26(6):1086-91; discussion 91-2.
 127. Schuller K, Buhler D, Plesnila N. A murine model of subarachnoid hemorrhage. *J Vis Exp*. 2013(81):e50845.
 128. Buhler D, Schuller K, Plesnila N. Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament. *Transl Stroke Res*. 2014;5(6):653-9.
 129. Feiler S, Friedrich B, Scholler K, Thal SC, Plesnila N. Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *J Neurosci Methods*. 2010;190(2):164-70.
 130. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-6.
 131. Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, Balbi M, Shrouder J, Liesz A, et al. Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(6):2084-97.
 132. Buhler D, Azghandi S, Schuller K, Plesnila N. Effect of decompressive craniectomy on outcome following subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. 2015;46(3):819-26.
 133. Wang Y, Emeto TI, Lee J, Marshman L, Moran C, Seto SW, et al. Mouse models of intracranial aneurysm. *Brain Pathol*. 2015;25(3):237-47.
 134. Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, et al. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*. 2002;296(5573):1661-71.
 135. Chimpanzee S, Analysis C. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*. 2005;437(7055):69-87.
 136. Yang G, Nowsheen S, Aziz K, Georgakilas AG. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther*. 2013;139(3):392-404.
 137. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9209-14.
 138. Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, et al. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *J Immunol*. 2009;182(9):5633-40.
 139. Horstkotte J, Perisic T, Schneider M, Lange P, Schroeder M, Kiermayer C, et al. Mitochondrial thioredoxin reductase is essential for early postischemic myocardial protection. *Circulation*. 2011;124(25):2892-902.
 140. Fukui K, Nakamura K, Shirai M, Hirano A, Takatsu H, Urano S. Long-Term Vitamin E-Deficient Mice Exhibit Cognitive Dysfunction via Elevation of Brain Oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61(5):362-8.
-

-
141. Whitin JC, Gordon RK, Corwin LM, Simons ER. The effect of vitamin E deficiency on some platelet membrane properties. *J Lipid Res.* 1982;23(2):276-82.
 142. Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr.* 1997;127(10):2060-4.
 143. Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee KS. A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods.* 2003;123(1):89-97.
 144. Altay T, Smithason S, Volokh N, Rasmussen PA, Ransohoff RM, Provencio JJ. A novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice. *J Neurosci Methods.* 2009;183(2):136-40.
 145. Muroi C, Fujioka M, Marbacher S, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, et al. Mouse model of subarachnoid hemorrhage: technical note on the filament perforation model. *Acta neurochirurgica Supplement.* 2015;120:315-20.
 146. Muroi C, Fujioka M, Okuchi K, Fandino J, Keller E, Sakamoto Y, et al. Filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage: surgical-technical considerations. *Br J Neurosurg.* 2014;28(6):722-32.
 147. Inoue S, Kawaguchi M, Kurehara K, Sakamoto T, Kishi K, Einaga T, et al. Mild hypothermia can enhance pial arteriolar vasodilation induced by isoflurane and sevoflurane in cats. *Crit Care Med.* 2002;30(8):1863-9.
 148. Deng J, Lei C, Chen Y, Fang Z, Yang Q, Zhang H, et al. Neuroprotective gases--fantasy or reality for clinical use? *Prog Neurobiol.* 2014;115:210-45.
 149. Hockel K, Trabold R, Scholler K, Torok E, Plesnila N. Impact of anesthesia on pathophysiology and mortality following subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Med.* 2012;4(1):5.
 150. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;9(2):112-21.
 151. Al-Khindi T, Macdonald RL, Schweizer TA. Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2010;41(8):e519-36.
 152. Wu L, Du Y, Lok J, Lo EH, Xing C. Lipocalin-2 enhances angiogenesis in rat brain endothelial cells via reactive oxygen species and iron-dependent mechanisms. *J Neurochem.* 2015;132(6):622-8.
 153. Rinaldo L, Rabinstein AA, Lanzino G. Elderly age associated with poor functional outcome after rupture of anterior communicating artery aneurysms. *J Clin Neurosci.* 2016;34:108-11.
 154. Traber MG. Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. *Adv Nutr.* 2014;5(5):503-14.
 155. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(3):CD007176.
 156. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005;142(1):37-46.
 157. Kemaloglu S, Ozkan U, Yilmaz F, Ak E, Acemoglu H, Olmez G, et al. Preventive effects of intracisternal alphatocopherol on cerebral vasospasm in experimental subarachnoid haemorrhage. *Yonsei Med J.* 2003;44(6):955-60.